

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL DİYABETİK RATLARDA NAR (*Punica granatum* L.)
ÇİÇEĞİNİN BEYİNDEKİ OKSİDATİF HASARA VE BİLİŞSEL
İŞLEVLERE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ
Zafer ÇAMBAY**

**Anabilim Dalı: Biyoloji
Programı: Genel Biyoloji**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ
2. Danışman: Doç Dr. Ramazan BAL**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 31 Ağustos 2009

AĞUSTOS-2009

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL DİYABETİK RATLARDA NAR (*Punica granatum* L.)
ÇİÇEĞİNİN BEYİNDEKİ OKSİDATİF HASARA VE BİLİŞSEL
İŞLEVLERE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ
Zafer ÇAMBAY

Anabilim Dalı: Biyoloji
Programı: Genel Biyoloji

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 31 Ağustos 2009

AĞUSTOS-2009

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında engin bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak bana destek olan ve tez çalışmamı yönlendiren danışman hocam Bingöl Üniversitesi Rektörü Sayın Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ'a, çalışmalarım süresince gösterdikleri ilgi ve sağladıkları çalışma ortamı nedeniyle 2.danışmanım FÜDAM Müdürü Doç. Dr. Ramazan BAL'a, verdiği büyük destek ve tüm yardımları için Biyoloji Bölüm Başkan Yardımcısı Yard.Doç.Dr. Mehmet TUZCU'ya, Bingöl Üniveritesi Sağlık Kültür ve Spor Daire Başkanı Abdullah YAŞAR'a ve Dr.İrfan EMRE'ye (F.Ü. Eğitim Fak.), FÜDAM personeline, Biyoloji bölümüne, daima yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu tez Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) yönetim birimi başkanlığı 1574 numaralı proje ve Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA) tarafından desteklenmiştir.

Zafer ÇAMBAY

ELAZIĞ-2009

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	III
SUMMARY.....	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VII
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
KISALTMALAR LİSTESİ.....	X
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı.....	2
1.2. Etiyolojik Tipler.....	3
1.2.1. Tip 1 Diabetes Mellitus.....	4
1.2.2. Tip 2 Diabetes Mellitus.....	5
1.2.3. Diğer Spesifik Diyabet Tipleri.....	6
1.2.4. Gestasyonel Diabetes Mellitus.....	9
1.3. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları.....	9
1.4. Deneysel Diyabet ve Serbest Radikaller.....	13
1.5. Fitoterapi.....	15
1.6. Nar (<i>Punica granatum</i> L.).....	17
1.6.1 Nar (<i>Punica granatum</i> L.) Çiçeği.....	19
1.6.1.1 Triterpenler.....	20
1.6.1.2 Stereoidler.....	21
1.6.1.3 Hidroksibenzoik asitler.....	21
1.6.1.4 Diğer Bileşikler.....	22
1.7. Hipokampus.....	23
1.8. Oksidatif Stres	25
1.9. Öğrenme ve Bellek.....	26
1.10. Oksidatif Stresin Hafıza ve Öğrenmeye Etkisi.....	28
1.11. Diyabetik Ratlarda Öğrenme Eksiklikleri.....	29
1.12 Glutasyon (GSH).....	29
1.13. Lipid Peroksidasyonu (LPO).....	30

1.13.1.	Lipid Peroksidasyonu, Prostoglandinlerin Nonenzimatik Etkileşimi.....	31
1.14.	Glial Fibriller Asidik Protein.....	31
2.	MATERYAL VE METOD.....	33
2.1.	Deney Hayvanları.....	33
2.2.	Deneysel Uygulamalar.....	34
2.3.	Morris Water Maze Testi.....	35
2.4.	Hipokampus Örneklerinin Alınması.....	36
2.5.	Hipokampus Örneklerinin Hazırlanması.....	37
2.6.	Hipokampus Örneklerinde Lipid Peroksidasyonu (LPO) Ölçüm Yöntemi.....	37
2.7.	Hipokampus Örneklerinde Glutasyon (GSH) Ölçüm Yöntemi.....	39
2.8.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	40
2.8.1	SDS-PAGE için jellerin hazırlanması.....	42
2.9	Hipokampus Örneklerinin SDS-PAGE ile Analizi.....	43
2.10.	Western Blot.....	44
2.11	Hipokampus Örneklerinin Western Blot ile Analizi.....	46
2.12.	İstatistiksel Metod.....	47
3.	BULGULAR.....	48
3.1.	Morris Water Maze Öğrenme Testinin Sonuçları.....	48
3.2.	Hipokampusta Lipid Peroksidasyonu Düzeyleri.....	53
3.3.	Hipokampusta Glutasyon Düzeyleri.....	54
3.4.	Hipokampusta GFAP Düzeyleri	55
4.	TARTIŞMA.....	56
5.	KAYNAKLAR.....	63
	ÖZGEÇMİŞ.....	

ÖZET

Diabetes mellitus, insülin etkisinin ya da insülin salgılanmasının veya her ikisinin bozukluğunun meydana getirdiği karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozukluklara neden olan kronik hiperglisemi olarak tanımlanır. Diyabetle birlikte ortaya çıkan oksidatif stres, çeşitli doku ve organlarda hasara neden olur. Diyabet, merkezi sinir sisteminde yaptığı hasar nedeni ile bilişsel fonksiyon bozukluklarına yol açar. Bu yüzden diyabet tedavisinde antidiyabetiklere ek olarak antioksidan maddelerin kullanılması oksidatif stresle başa çıkabilmek için tavsiye edilmektedir. Türkiye'deki etnobotanik çalışmalar antioksidan etki gösteren bitkilerin kullanımı diyabetin semptomlarını hafiflettiğini göstermektedir. Son zamanlarda nar çiçeğinin antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada diyabetteki hasarlarda oksidatif stresin rolü ve *Punica granatum* çiçeğinin antioksidan aktivitesi bu stresle başa çıkabilmedeki etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada ratlar kontrol, diyabet (STZ), STZ + Nar çiçeği I (300 mg/kg/gün), STZ + Nar çiçeği II (400 mg/kg/gün), ve STZ + Nar çiçeği III (500 mg/kg/gün), diye adlandırılan beş gruba ayrıldı. Morris water maze (MWM) testi uygulandıktan sonra sakrifiye edilerek hipokampusta GFAP, LPO ve GSH düzeyleri belirlendi.

Diyabet, kontrol ve nar çiçeği verilen diyabetik gruplardaki Morris Water Maze ve Probe testi sonuçları STZ grubunun diğer gruplara göre öğrenme ve bellek fonksiyonlarının bozuk olduğunu göstermiştir. Diğer gruplara göre kontrol grubuna en yakın hafıza ve öğrenme testi başarısı gösteren grubun STZ+NÇ-III grubu olduğu ve bu grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel fark bulunmadığı belirlendi. ($p<0.05$).

Diyabet grubunda, GSH düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak düşüktür ($p<0.05$). GFAP ekspresyonu ve LPO düzeyi ise yüksekti ($p<0.05$). Diyabetik gruplara nar çiçeği uygulanması sonucu STZ+NÇ-III grubuyla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark yoktur. GFAP ekspresyonu diğer gruplara göre STZ grubunda daha yüksektir. STZ+NÇ-II ve STZ+NÇ-III gruplarındaki GSH değerleri ise anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0.05$). STZ grubuna göre STZ+NÇ-I, STZ+NÇ-II ve STZ+NÇ-III gruplarındaki LPO değerleri anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$).

Bu sonuçlar nar çiçeğinin diyabetin tedavisi ve oluşturduğu hasarlardan korunma yöntemlerinin geliştirilmesine önemli katkı sağlayacağını göstermektedir. Özellikle bilimsel çalışmalarla elde ettiğimiz verilerin diyabetin komplikasyonlarının önlenmesinde kullanılan alternatif tıbbi bilimsel bir bakış açısı kazandırdığı düşüncesindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Bilişsel İşlev, Diyabet, GFAP, Oksidatif Stres, Nar Çiçeği

SUMMARY

Investigation of Effects of Pomegranate (*Punica granatum* L.)' Flowers on Oxidative Damages in the Brain and Cognitive Functions of Experimental Diabetic Rats

Diabetes mellitus are termed as 'chronic hyperglycemia' leading to disturbances in carbohydrate, lipid or protein metabolism as consequences of inefficiency of insulin, insufficiency of insulin release or both. Oxidative stress induced during the course of diabetes mellitus leads to damages in various tissues and organs. Due to the damages to central nervous system, diabetes mellitus affects cognitive functions. Therefore, for the treatment of diabetes mellitus, in addition to antidiabetics, antioxidants are advised to be used to cope with oxidative stress. The ethnobotanic investigation carried out in Turkey showed that use of plants with antioxidant properties decrease the severity of the symptom of diabetes mellitus. Recently, it has been reported that flowers of pomegranata have antioxidant properties. In the current study, the role of oxidative stress in the formation of damages associated with diabetes mellitus and antioxidant ability of pomegranata's flowers to cope with the oxidative stress were investigated.

In the current study, rats were divided into five groups: diabetes (STZ), STZ + the flowers of pomegranata I (PGF-I) (300 mg/kg/day), STZ + the flowers of pomegranata II (PGF-II) (400 mg/kg/day), STZ + the flowers of pomegranata III (PGF-III) (500 mg/kg/day).

The findings from Morris Water Maze and Probe tests in diabetes mellitus, control and flowers of pomegranata receiving animal groups showed that the animals in STZ group had disturbances in learning and memory performances compared to the other groups. The group that showed best performances in learning and memory tests closest to those of control animals among other experimental groups were STZ + PGF III group. There were no significant difference between control and STZ + PGF III group ($p < 0.05$).

In diabetes mellitus group, the level of GSH was significantly lower ($p < 0.05$). Whereas, the levels of LPO and GFAP expression were higher ($p < 0.05$). There were no significant difference between the levels of GFAP in STZ + PGF-III and control. The level of GFAP expression were higher in STZ group compared to those of the other groups. The level of GSH in STZ +PGF-I, STZ +PGF-II and STZ +PGF-III groups were significantly higher ($p < 0.05$). The levels of LPO in STZ +PGF-I, STZ +PGF-II and STZ +PGF-III groups were significantly lower compared to that of STZ group.

These findings show that flowers of pomegranata may have considerable contribution to treatment of diabetes mellitus and prevention from the damages induced by diabetes mellitus. Particularly, the data obtained by the current scientific study endow a scientific point of view to the

commonly used alternative medicine about the importance of supportive curing approaches towards the prevention of diabetic complications.

Keywords: Cognitive Functions, Diabetes Mellitus, Flowers of Pomegranata, GFAP, Oxidative Stress

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.	Nar (<i>Punica granatum</i> L.)	18
Şekil 2.	<i>Punica granatum</i> L. Çiçeği	19
Şekil 3.	Water Maze Testi platformu bulma süreleri.....	49
Şekil 4.	Water Maze Testi: platformu bulmak için katedilen yüzme mesafesi.....	50
Şekil 5.	Probe testi.....	51
Şekil 6.	Hedef kuadrana giriş sayıları.....	52
Şekil 7.	Hipokampusta LPO (MDA+4-HDA) düzeyleri.....	53
Şekil 8.	Hipokampusta GSH (glutatyon) düzeyleri.....	54
Şekil 9.	Hipokampusta GFAP düzeyleri.....	55

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.	Diabetes mellitusun etyolojik sınıflaması.....	3
Tablo 2.	Diğer spesifik diyabet tipleri.....	8
Tablo3.	Diabetes mellitusun komplikasyonları.....	10
Tablo 4.	Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi.....	33
Tablo 5.	Separating jelinin hazırlanması.....	42
Tablo 6.	Stacking jelin hazırlanması.....	42
Tablo 7.	Örnek solusyonların hazırlanması.....	43
Tablo 8.	Deney hayvanlarının ortalama vücut ağırlıkları.....	48

KISALTMALAR LİSTESİ

4-HDA	:4-Hidroksialkenal
ACE	:Anjiotensin converting enzim
ADA	:Amerikan diabetes associaton
AGEs	:Glikozilasyon son ürünleri
AT	:Anjiotensin
DAG	:Diaçilgliserol
DM	:Diabetes mellitus
DPPH	:2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA	:Etilen diamin tetraasetik asit disodyum
eNOS	:Endotelyal nitrik oksid sentetaz
FGF	:Fibroblast growth faktör
GDM	:Gestasyonel diabetes mellitus
GFAP	:Glial fibriler asidik protein
GH	:Büyüme hormonu
GLUT	:Glukoz transport protein
GR	:Glutasyon redüktaz
GSH	:Glutasyon veya γ -glutamil-sisteinil-glisin
GSH-Px	:Glutasyon peroksidaz
GST	:Glutasyon-S-transferaz
HNE	:Hidroksinonenal
HNF	:Hepatik nükleer faktör
HPLC	:High-performance liquid chromatography
IFG	:Bozulmuş açlık glukozu
Ig	:İmmünoglobülin
IGF	:İnsülin like growth faktör
IGT	:Bozulmuş glukoz toleransı

LPO	:Lipid peroksidasyonu
LTP	:Long term potentiation
MDA	:Malondialdehit
MMP	:Metalloproteinaz
MODY	:Maturity onset diabetes of the young
MWZ	:Morris water maze
NADPH	:Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NÇ	:Nar Çiçeği
NO	:Nitrik oksid
OGTT	:Oral glukoz tolerans testi
PDGF	:Platelet-Derived growth faktör
PG	: <i>Punica granatum</i>
PGF	: <i>Punica granatum</i> çiçeği
PKC	:Protein kinaz-C
PPAR	:Peroksizom proliferator aktive edici reseptör
PUFA	:Poliansature yağ asitleri
RNS	:Reaktif nitrojen türevleri
ROS	:Reaktif oksijen türleri
STZ	:Streptozotosin
TGFβ	:Transforming growth faktör beta
TNF	:Tümör nekrozis faktör
VEGF	:Vasküler endotelyal growth faktör
WHO	:World health organization (Dünya sağlık örgütü)

1.GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM) insülin etkisinin ya da insülin salgılanmasının veya her ikisinin bozukluğunun meydana getirdiği karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozukluklara neden olan kronik hiperglisemi olarak tanımlanır. DM uzun dönemde çeşitli organlarda (gözler, böbrekler, kalp, beyin, kan hücreleri) hasarlar, fonksiyon bozuklukları ve yetersizlikler ile seyreder [1]. Dünya genelinde diyabetli hastaların sayısı çarpıcı olarak artmaktadır. Gerçekten, dünya genelinde 2015 yılında diyabetli insanların sayısının 230 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Diyabet kontrol ve komplikasyonlarını araştırma da kan glukozunun sıkı şekilde kontrolünün diyabetin klinik komplikasyonlarını azaltmada önemli derecede etkili bir strateji olduğunu fakat kan glukozunun optimal kontrolünün bile komplikasyonları engellemeyeceğini bildirilmiştir [2]. Diyabet, kronik metabolik bir bozukluk olduğu gibi aynı zamanda da artmış bir oksidatif stres durumudur. Diyabette artmış serbest radikaller lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına, proteinlerde yapısal veya fonksiyonel değişikliklere ve genetik mutasyonlara yol açmaktadır [3]. Diyabetteki oksidatif strese rol oynayan serbest radikaller süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, nitrik oksittir. Ayrıca pek çok çalışma diyabetik komplikasyonlar ve lipid peroksidasyonu arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Bu yüzden lipid peroksidasyonunun kontrolü çok önemlidir [4]. Diyabet, kendini ağız kuruluğu, poliüri, görme bozukluğu, kilo kaybı, polifaji, ağır formlarında tedavi edilmediğinde stupor, koma, hatta ölüme neden olan ketoasidosis ya da nonketotik hiperosmolar hiperglisemi gibi semptomlarla gösterir. Çoğunlukla semptomlar ağır değildir, bazen hiçbir semptom da görülmeyebilir [5]. Yetişkinlerde, DM ile birlikte orta düzeyde öğrenme ve hafıza bozukluğu da görülmektedir [6]. Kronik hiperglisemi boyunca DM, bilişsel bozukluğa neden olmaktadır [7].

Streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan sıçanlarda, öğrenme ve hafızada bozukluk (zayıflama) olduğu bildirilmiştir [8]. Diyabetik sıçanlardaki öğrenme ve hafıza bozukluklarının, hipokampal sinaptik plastisiteye bağlı olduğu görülmüştür. Glial fibriller asidik protein (GFAP) matür astrositlerin major intermediate filamentidir. Astrosit farklılaşması süresince anahtar olaylardan biri, GFAP ekspresyonunun yapılmasıdır. GFAP astrosit olgunlaşma belirteci olarak tanınır.

GFAP fetal yaşamda son derece az miktarda iken, beynin gelişimi ile yoğunluğu artar [9]. STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda GFAP düzeyleri nöronal hasara bağlı olarak arttığı bulunmuştur [10].

Diyabetlilerde protein glikasyonu ve glukoz otooksidasyonu, sonradan lipid peroksidasyonu (LPO)'nu katalizleyen serbest radikaller üretebilir [11]. Bunların yanı sıra diyabetlilerde antioksidan savunma sisteminin bozuklukları; antioksidan enzimlerde değişiklik, bozulmuş glutatyon (GSH) mekanizması ve azalmış askorbik asit seviyeleri ile gösterilmiştir [12]. Oksidatif strese sebep olan serbest radikal gruplarından biri reaktif oksijen türleri (ROS)'dir. ROS diyabetlilerde yükselir. Diyabetle birlikte ortaya çıkan oksidatif stres hafıza ve öğrenme bozukluklarına yol açar. STZ ile diyabet oluşturulan sıçanların çeşitli beyin bölgelerinde LPO seviyeleri yüksek, GSH seviyeleri düşük bulunmuştur [13].

1.1.Diabetes Mellitus'un Tanımı:

DM insülin hormon sekresyonunun ve/veya insülin etkisinin mutlak veya göreceli azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik bir grup metabolizma hastalığıdır [14]. DM klinik olarak polidipsi, poliüri, polifaji, pruritus, ağırlık kaybı gibi klasik belirtiler ve hastalığa spesifik retinopati, nöropati, nefropati gibi komplikasyonlar ile şüphe edilebilir veya tanınabilir. Sonuç olarak DM sıklıkla rutin kan ya da idrar glukoz testinin normal olmayan sonuçlarından ya da komplikasyonun varlığından dolayı tespit edilir. Bazı durumlarda diyabet, gestasyonel diabetes mellitus (GDM) veya gebelikte görülen glukoz intoleransı gibi örneklerde olduğu gibi kolaylıkla fark edilebilir. Bazı kişilerde diyabet gelişme olasılığı glukoz tolerans anomalilerinden önce de tanımlanabilir [14].

1.2. Etiyolojik Tipler:

World Health Organization (WHO Dünya Sağlık Örgütü) ve ADA (Amerikan Diabetes Association) tarafından tavsiye edilen DM' un etiyolojik sınıflandırması Tablo 1.'de gösterilmektedir [16]. Bu tabloda hastalar etiyolojik karakteristiklerine göre sınıflandırılmışlardır. Tip 1 ve Tip 2 diyabet terimleri DM' un genel formları için uyarlanmıştır [14].

Tablo 1. Diabetes mellitusun etiyolojik sınıflaması [14]

I. Tip 1 Diabetes Mellitus: β hücre yıkımı genellikle mutlak insülin yetmezliğine neden olur.
A. Otoimmün
B. İdiopatik
II. Tip 2 Diabetes Mellitus: Belirgin insülin direnci yanında, göreceli insülin eksikliği ile belirgin insülin sekresyon bozukluğu yanında, göreceli insülin direnci arasında değişebilir.
III. Diğer spesifik tipler (Tablo 2.'de)
A. β hücre fonksiyonunun genetik defektleri
B. İnsülin etkisindeki genetik defektler
C. Ekzokrin pankreas hastalıkları
D. Endokrin hastalıklar
E. İlaç ve kimyasal maddelere bağlı gelişen diyabet
F. Enfeksiyonlara bağlı gelişen diyabet
G. Otoimmüniteye bağlı nadir diyabet formları
H. Diyabetle birlikte olan diğer genetik sendromlar
IV. Gestasyonel Diabetes Mellitus

1.2.1. Tip 1 Diabetes Mellitus:

Tip 1 diyabet, β hücre yıkımının olduğu hastalık formudur. Bu tip hastalık genellikle hayatta kalmak için insülin gerektiren diyabet tiplerinin başında gelir. Tip 1 diyabetli hastalar, klinik olarak hastalığın açıkça ortaya çıkmasından önce metabolik olarak normal durumdadırlar fakat bazı otoantikörlerin varlığı sayesinde β hücre yıkımının süreci daha erken gözlenebilir. İnsüline bağımlı diyabet genellikle 25 yaşından küçük kişilerde ve ağırlıklı olarak 15 yaşından önce görülür. Bu tür diyabette insülin yetersizliği vardır. Hastalığın belirtileri aniden başlar, insülinin salgılandığı pankreasın Langerhans adacıkları üzerindeki beta hücrelerinin sayısı azalır, hatta bu hücre kaybı dolaşımdaki insülinin ortadan kalkmasına kadar devam eder. Total diyabet hastalarının yaklaşık % 10'u insüline bağımlıdır. Diyabet hastalığının otoimmün bir hastalık olduğu ve beta hücrelerinde tahribin meydana geldiği konusunda genel bir görüş birliği vardır [34].

Tip 1 diyabet genellikle β hücre yıkımına sebep olan otimmün sürece etki eden anti glutamik asit dekarboksilaz, anti adacık hücre ya da anti insülin antikörlerinin varlığı ile karakterizedir. Bu antikörlerin bir veya birkaçına sahip bireyler Tip1 A, immün aracılı Tip 1 diyabet olarak alt gruplara sınıflandırılırlar [17]. Otoimmün kaynaklı tip 1 diyabet; Genetik yatkınlığı olan bireylerde pankreas β hücrelerinin yıkımı sonucunda oluşan otoimmün bir hastalıktır. Hastalığın etyolojisinde genetik yatkınlık, otoimmünite ve çevresel faktörler rol oynamaktadır. Tip 1 diyabetin bu formu, progresif seyirli, tekrarlayan ketozis atakları, ketozisin engellenmesi ve hayatta kalım için insüline gereksinim duyan hiperglisemi ile karakterizedir. Bu tip bireyler Tip1 B veya idiopatik diyabet olarak sınıflandırılır [18]. İdiopatik tip 1 diyabet; Çocukluk yaş grubunda nadiren otoimmünite bulguları olmaksızın insülin eksikliğine bağlı diyabet saptanmaktadır. Bu grup hastalar idiopatik tip 1 diyabet olarak sınıflandırılmaktadır. Etiyolojisi bilinmemektedir. Tip 1 diyabetli hastaların çok az bir kısmı bu gruba girer. Tip1 B ya da idiopatik diyabet, Tip1 A'da olduğu gibi düşük C peptid ve insülin seviyeleri ile karakterizedir. Böyle hastalar ketoasidozise yatkındırlar, buna rağmen laboratuvar olarak tespit edilebilen herhangi bir otoimmün antikora sahip değildir.

Bu hastaların bir çoğu Afrika ve Asya kökenlidir. Bunlarda epizodik ketozis oluşabilir, fakat insülinopeninin patogenetik mekanizması bilinmemektedir [14].

1.2.2. Tip 2 Diabetes Mellitus:

Tip 2 DM en yaygın görülen diyabet formudur. İnsülinin etkisinde veya insülin salınmasında bozukluk ile karakterizedir. Bu bozukluklardan birisi predominanttır. Sıklıkla iki bozukluk da zamanla oluşur ve klinik olarak diyabet belirgin hale gelir. Diyabetin bu türünün spesifik etyolojisi bilinmemesine rağmen, β hücrelerinin otoimmün yıkımı meydana gelmez. Tip 2 diyabet genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkar. Bu tip diyabette insülin sekresyon yeteneği total olarak kaybedilmemiştir. Aynı zamanda beta hücrelerinin sayısı da normaldir. Bu nedenle bu form, yaşlılık diyabeti olarak isimlendirilir. Hastalığın başlangıcı ve varlığı belirgin değildir. Tip 2 diyabette insülin salgılanmasının yetersiz oluşu hastalığın nedenlerinden biridir. Yavaş gelişme gösteren tip2 diyabette insülinin etkilediği doku hücre membranlarındaki insülin reseptörlerinin yetersiz olduğu bu yüzden glukozun hücrelere yeterince alınmaması ve kullanılmaması durumuyla karşılaşılmalıdır. Bu durum tip 2 diyabetin nedenlerinden biri olup vücutta insüline karşı bir direncin ortaya çıkması olarak tanımlanmaktadır [35]. Tip 2 diyabet hastaları genellikle tam insülin eksikliğinden ziyade insülin direncine sahiptir. Tip 2 diyabetli hastalar, tanı zamanında, genellikle yaşamları süresince, hayatta kalmak için, insülin tedavisine ihtiyaç duymazlar, fakat sonunda çoğu glisemik kontrol için insülin tedavisine gereksinim duyarlar. Diyabetin bu formu, diyabetin seyri süresince progresif β hücre yetersizliğine bağlıdır [19]. Ketoasidozis nadiren kendiliğinden oluşur, fakat enfeksiyon veya stres durumunda da meydana gelebilir. Tip 2 diyabet hastalarının çoğu, kendilerinde diyabet gelişirken obezdirler ve obezite insülin direncini şiddetlendirir. Tip 2 diyabetlilere sıklıkla uzun yıllar tanı konmaz, çünkü hiperglisemi derece derece gelişir ve erken evrelerde diyabetin klasik semptomlarını oluşturacak şiddette değildir, böyle hastalar makro ve mikro vasküler komplikasyonların gelişimi açısından risk altındadırlar. İnsülin seviyesi normal veya artmış olabilir, fakat insülin direncinden dolayı kan glukoz seviyesinin kontrolü yetersizdir. Bu nedenle bu hastalar insülinopeni ile aynı değil, bağlantılıdır.

İnsülin direnci, kilonun azalması veya farmakolojik tedavi ile gliseminin normalleşmesi sonucu düzelebilir [20]. Tip 2 diyabet sıklıkla kadınlarda görülür. Bu kadınların gestasyonel diyabet geçmişleri vardır, ayrıca hipertansiyon, dislipidemi gibi insülin direnci sendromlarının karakteristik yapılarına sahip bireylerdir. Tip 1 diyabet ile ilişkisi olan ve obez olmayan hastalar (ki bunlar genellikle Avrupa kökenlidir), Tip 2 diyabet ile tutarlı klinik görüntü gösterebilir, fakat Tip 1 diyabetlilerde bulunduğu gibi otoantikorlara sahip olabilirler. Tip 1 A diyabeti olan böyle hastalar, otoantikor ayrımı yapılmadıkça Tip 2 diyabet gibi görülebilir [21].

1.2.3. Diğer Spesifik Diyabet Tipleri:

Diyabetin diğer spesifik tipleri; kendilerinde, temel defekt veya hastalığın süresi nispeten spesifik bir yolda teşhis edilebilen diyabet hastalarıdır. Bu kategori diğer spesifik durumlardaki veya etyolojisi bilinmeyen sendromlara veya çeşitli hastalara bağlı sekonder diyabet tiplerinin bir karışımıdır [22].

Diyabetin diğer spesifik tiplerinin nedenleri ve sınıflaması, Tablo 2.'de gösterilmektedir. Bunlar spesifik monogenetik defektlerle ilişkili değişik diyabet tipleridir ve β hücre fonksiyonlarında genetik defekt ile karakterizedir. Bunların çoğu erken yaşlarda hiperglisemi ve kalıtımın otozomal dominant oluşuyla karakterizedir. Bunlar çoğunlukla geç çocukluk veya erken erişkinlik çağında oluşan diyabet (MODY=maturity onset diabetes of the young) olarak bilinirler. Bunlar insülin sekresyonunda azalma veya insülin etkisinde defekt olmaması veya minimal defekt olması ile karakterizedir. Otozomal dominant kalıtım gösterirler, fakat heterojendirler. Çok sayıda spesifik genetik defekt tespit edilmiştir. Bunlar, HNF4 α (MODY1), glukokinaz (MODY2), HNF1 α (MODY3), insülin promoting faktör-1 (MODY4) ve HNF3 β genleri (MODY5)'i içerir [29].

Diğer β hücre fonksiyonu genetik defekti, mitokondrial DNA'daki mutasyondan kaynaklanır. Mitokondrial DNA değişimi 3243. pozisyondaki Leu-Ala genindedir, sağırlıkla birlikte görülen DM'a neden olur [23]. Aynı mitokondrial kalıtım MELAS (Mitokondriyal myopati, ensefalopati, laktik asidoz, inme (stroke) benzeri sendrom) sendromunda da vardır, fakat diyabet bu sendromun bir parçası değildir [24].

Diyabetin bazı formları, insülinin veya insülin etkisinin genetik defekti ile ilişkili otozomal dominant kalıtmıdır [25]. Diyabetin bu formunda, proinsülin insüline çevrilememektedir. Genelde glukoz intoleransı hafiftir. Sınırlı sayıda insülin geninde spesifik mutasyon, anormal yapıda insülin ve sonuçta insülinin reseptöre bağlanmasında bozulma tespit edilmiştir. Bu diyabet tipinde normal veya hafif bozulmuş glukoz metabolizması olabilir, fakat sirkülasyonda insülin veya C-peptid seviyesi yüksektir. İnsülin reseptör geninin spesifik mutasyonlarının bir çoğu tanımlanmıştır, bunlar insülin etkisinde bozukluk (azalma) oluştururlar [26]. Diyabetin çok nadir sebepleri olmalarına rağmen, bunlar, eğer sirkülasyondaki insülin seviyesi fazla yüksekse ve eğer insülin rezistans sendromunun diğer klinik özellikleri, örneğin; akantozis nigrikans, ovarian disfonksiyon, hiperandrogenizm, lipodistrofi veya aşırı hipertrigliseridemi varsa göz önünde tutulmalıdır. Eğer Sjögren Sendromu, sistemik lupus eritematozis, Ataksi-Telenjiyektazi gibi diğer otoimmün hastalıklar mevcutsa, insülin reseptör otoantikorlarından kaynaklanan diyabet olasılığı göz önünde bulundurulmalıdır. Genetik nedenli insülin etki defekti, leprechaunizm, Rabson Mendenhall sendromu ve lipoatropik diyabetiklerde bulunur [14].

DM ekzokrin pankreas hastalığında sekonder oluşabilir. 1985 WHO sınıflamasında malnutrisyona bağımlı diyabetin bir alt grubu olan fibrokalkuloz pankreatopati şimdi bu kategoride yerini alıyor. Pankreatit, pankreatektomi, pankreasın neoplastik hastalıkları, kistik fibrozis ve hemokromatozis diyabete neden olabilir. Ekzokrin pankreas yetersizliğinin spesifik formlarından olan ve PEK geninin anormalliğine bağlı Wolcott-Rallison sendromu erken başlayan diyabet ve multipl epifizyel displaziye neden olur [27]. DM çeşitli endokrinopatilerin sonucu oluşabilir. Cushing sendromu, akromegali, feokromositoma, glukagonoma, hipertiroidizm ve somatostatinoma ile birlikte olabilir. Bazı ilaçlar veya kimyasallar diyabet gelişimi ile ilişkilidir. Bunlardan bazıları glukokortikoidler, nikotinik asit, diazoksid, fenitoin, pentamidindir. Bu ilaçlar veya kimyasalların, direkt olarak diyabet oluşturduğu veya diyabetin, bu ilaçlarla bir araya geldiğinde tesadüfen mi görüldüğü kuşkuludur. Bazı enfeksiyonlar diyabete sebep olabilir (konjenital rubella ve sitomegalovirus enfeksiyonları) [28]. Bazı genetik sendromlarla birlikte diyabet görülebilir (Down sendromu, Klinefelter sendromu, Turner sendromu).

Tablo 2. Diğer spesifik diyabet tipleri [14]

β hücre fonksiyonu genetik defektleri	Ekzokrin pankreas hastalıkları
20. kromozom, HNF4 α (MODY1)	Fibrokalkuloz pankreatopati
7. kromozom, glukokinaz (MODY2)	Pankreatit
12. kromozom, HNF1 α (MODY3)	Travma/pankreatektomi
13. kromozom, IPF1 (MODY4)	Neoplazi
17. kromozom, HNF3 β (MODY5)	Kistik fibrozis
Mitokondrial DNA, A3243G	Hemokromatozis
mutasyon	
Diğerleri	Wolcott-Rallison sendromu
İnsülin etkisinin genetik defektleri	Diğerleri
Tip A insülin rezistansı	Endokrinopatiler
Leprechaunism	Cushing sendromu
Rabson-Mendenhall sendromu	Akromegali
Lipoatrofik diyabet	Feokromositoma
Diğerleri	Glukagonoma
	Hipertiroidizm
Diyabet ile ilişkili diğer genetik sendromlar	
Down sendromu	Somatostatinoma
Friedreich ataxia	Diğerleri
Huntington hastalığı	İlaç ve kimyasal nedenler
Klinefelter sendromu	Nikotinik asit
Lourence-Moon-Biedl sendromu	Glukokortikoidler
Myotonik distrofi	Tiroid hormonu
Porphyria	α -adrenerjik agonistler
Prader-Willi sendromu	β -adrenerjik agonistler
Turner sendromu	Tiazidler
Wolfram sendromu	Fenitoin
Diğerleri	Pentamidin
İmmün aracılı diyabetin nadir formları	Pyriminil
İnsülin otoimmün sendrom	İnterferon- α
Anti-insülin reseptör antikorları	İnfeksiyonlar
Stiff-man sendromu	Konjenital rubella
Diğerleri	Cytomegalovirus

HNF4 α ; hepatik nükleer faktör 4 α , MODY; maturity onset diabetes of the young, HNF 1 α ; hepatik nükleer faktör 1 α , IPF1; insülin promoting faktör 1, HNF3 β ; hepatik nükleer faktör 3 β .

1.2.4.Gestasyonal Diabetes Mellitus:

Gestasyonal DM, gebelik döneminde başlayan veya ilk olarak gebelikte teşhis edilen hiperglisemi ile birliktelik içinde olan karbonhidrat intoleransıdır [16]. Bu tanımlama daha önce tanımlanmamış glukoz intoleransını veya gebelik öncesi diyabet olasılığını ortadan kaldırmaz. Gebelik öncesi diyabet olduğunu bilen hamile kadınlar, GDM değildirler.

Hamileliğin erken dönemlerinde, açlık ve postprandial glukoz konsantrasyonu hamile olmayan kadınlara göre normal olarak düşüktür. Bu zaman içinde açlık veya postprandial glukoz seviyesindeki herhangi bir yükseliş gebelik öncesi diyabetin varlığını yansıtabilir. Fakat gebeliğin bu evresindeki anormalliği belirtmek için gerekli spesifik kriterler saptanmamıştır.

GDM için yüksek risk grubundaki kişiler; glukoz intoleransı hikayesi olan yaşlı kadınlar, önceki hamileliklerinde gestasyonel yaşın uzun olduğu bebek doğurmuş yaşlı kadınlar, Tip 2 diyabetin yüksek riskine sahip etnik gruplardan gelen kadınlar ve açlık veya tesadüfi kan glukoz seviyesinin yüksek olduğu hamile kadınlardır [29].

1.3.Diyabetes Mellitusun Komplikasyonları

Diyabet, akut ve kronik komplikasyonlarla seyreden bir hastalıktır. Kronik dejeneratif komplikasyonlar, en ciddi sağlık sorunlarından birini oluşturur. Uzun süre diyabeti olan olgularda tüm damarlarda bozukluklar gelişir. Değişiklikler hem kapiller ve arteriollerini yapan vasküler hücreleri, hem de bunların bazal membranlarını tutar. Bütün mikrovasküler yapılar tutulmuş olmasına karşın, klinik olarak ancak retina, renal glomerüller ve büyük sinirlerde patoloji ortaya çıkar [14]. DM komplikasyonları Tablo 3.'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Diabetes mellitusun komplikasyonları

Akut komplikasyonlar
1. Hipoglisemi ve hipoglisemi koması
2. Diyabetik ketoasidoz koması
3. Hiperosmolar nonketotik koma
4. Laktik asidoz koması
Kronik komplikasyonlar
1. Diyabetik nefropati
2. Diyabetik retinopati
3. Diyabetik nöropati
4. Diyabetik ayak
5. Kardiyovasküler hastalık ve hipertansiyon

Diyabetin komplikasyonları, insülin homeostazisi ve enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stresin bir sonucu olarak meydana gelmektedir [30]. Diyabet hastalığı zaman zaman asidoz ve komaya yol açmakla kalmamakta, uzun süren diyabette diğer komplikasyonlar da gelişmektedir. Bu komplikasyonlar uzun süreli hiperglisemi ile beraberdir ve kısmen dokularda sorbitol birikmesi ya da çapraz köprüler bulunan matriks proteinlerinde glikozillenmiş son ürünlerin oluşmasına bağlı olabilir. Diyabetin nedeni daima insülinin etkilediği doku düzeyinde bir eksiklik olması ise de bu eksiklik çeşitli anomalilere bağlı olabilir. Yani diyabet hastalığı pek çok nedenleri olan bir sendromdur. Diabetes mellitusun tip 1 ve tip 2 gibi sık rastlanan iki formu bulunur. Ayrıca diyabet, pankreasın cerrahi olarak çıkarılması, pankreasın beta hücrelerinin seçici yıkımına neden olacak uygun dozlarda alloksan, streptozotosin ya da diğer toksinlerin verilmesi, insülin sekresyonunu inhibe eden ilaçların verilmesi ve anti-insülin antikorlarının verilmesiyle de oluşturulabilir. Tip 1 diyabet insülinine bağımlı bir diyabet hastalığı iken tip 2 diyabet insüline bağımlı olmayan ve ilerleyen yaşlarda ortaya çıkan bir diyabet hastalığıdır [31].

Diyabetik komplikasyonların oluşumu iki mekanizma ile açıklanmaktadır. İlk mekanizmada, özellikle iyi kontrol edilmeyen diyabette proteinlerin nonenzimatik glikozillenmesinin arttığı ve glikozillenen bu proteinlerin oksidasyonu sonucu serbest radikallerin oluştuğu savunulmaktadır. Plazma membran proteinleri ve insülin bağımsız glukoz alan lens gibi dokuların hücrelerindeki proteinler uzun süre yüksek konsantrasyonda glukoz ile karşı karşıya kalırsa, glukoz hızla proteinlerin amino gruplarına nonenzimatik bir yolla bağlanır. Bunun tipik örneği glikozillenmiş hemoglobindir [32]. İkinci mekanizmada, diabetes mellitusta artan kan glikozuna paralel olarak insülin bağımsız glukoz alan dokuların hücrelerinde glukoz konsantrasyonunun yükseldiği ve bu dokulardaki artmış glukozun fosforile olmadan enzimatik olarak sorbitol üzerinden fruktoza fazla miktarda dönüştüğü ve bunları metabolize etmeye yetecek kadar ilgili enzim olmadığından hücre içinde sorbitol ve fruktozun biriktiği iddia edilmektedir. Sorbitol ve fruktozun aşırı miktarda birikmesiyle meydana gelen osmotik değişimler bu doku ve organların yapısına bağlı olarak patolojik hallerin sebebi sayılmaktadır [33].

DM'in akut komplikasyonları; Kandaki şeker düzeyinin normalin çok altına inmesi halinde de koma görülebilir. Şeker düşüklüğü koması, tıpta hipoglisemi koması olarak adlandırılır. Özellikle tedavi görüp insülin ya da şeker düşürücü haplar kullanan kişiler, yemek yemezler ya da yemeleri gerekenin çok altında yemek yerlerse, kandaki şeker düzeyleri normalin çok altına iner. Hipoglisemi öncelikle, şiddetli bir açlık hissi, sinirlilik, titreme, soğuk terleme gibi belirtilerle ortaya çıkar. Şeker düşmesi arttığına koma tablosu ortaya çıkar. Şeker yüksekliği sırasında görülen başka bir koma türü de ketoasidoz komasıdır. İnsülin yetersizliği nedeniyle glikoz gibi şekerli maddeleri kullanamayan vücut, gerekli enerjisini vücuttaki yağları yakarak karşılar. Yağların yakılması sırasında vücutta keton maddeleri birikmeye başlar. Bu da kanın asit-alkali dengesini bozarak hastanın komaya girmesine neden olur. Bu komanın öncekinden farkı hastanın nefesinin çürük elma ya da aseton gibi kokmasıdır. Hiperosmolar nonketotik koma ise tip 2 diyabetiklerde görülen bir yüksek şeker komasıdır. Tip 2 diyabetiklerde hala çok az miktarda da devam eden vücuttaki insülin salgılanması şekerin yükselmesini önleyemez ancak yağların yakılması ve asit cisimciklerinin ortaya çıkmasını engeller.

Daha çok evde yalnız yaşayan, bakımı iyi olmayan yaşlı tip 2 diyabetiklerde gelişen bu komplikasyonda şeker çok daha yüksek 600 mg/dl düzeylerinin üzerinde olmasına rağmen idrarda aseton belirtilen nedenlerden dolayı ya hiç yoktu veya çok az miktarlardadır. Laktik asidoz, vücutta laktik asit birikmesidir. Hücreler enerji olarak glukoz dışı yakıt kullandıklarında laktik asit yaparlar. Eğer çok fazla laktik asit vücutta kalırsa, denge bozulur ve kişi kendini rahatsız hissetmeye başlar. Daha az sıklıkta görülen bu durum, esas olarak tip 2 diyabetli kişileri etkiler [16].

DM'in kronik komplikasyonları: Diyabetik nefropati; diyabetik bir hastada mikroalbuminüriden nefrotik düzeyde proteinüri ve/veya son dönem böbrek yetmezliğine kadar bir spektrum içeren böbrek hastalığıdır. Dializ merkezlerindeki hastaların yaklaşık yarısını diabetik nefropatiye bağlı hastalıklar oluşturur. Diyabetik hastaların tedavisindeki gelişmelere paralel olarak erken kardiyovasküler ölümler azalmakta ancak kronik komplikasyonların görülme prevalansı artmaktadır. Tip 1 DM bulunan vakalarda ortalama 5 yıldan sonra görülürken tip 2 DM vakalarında tanı anında da diabetik nefropati bulunabilir. Diyabetli bir hastada diyabetik nefropati olmadan bir başka böbrek hastalığına bağlı proteinüri /böbrek fonksiyon bozukluğu %10-20 oranında görülebilir. Diyabetik retinopati: Diyabetik retinopati retinal kapillerlerin hastalığıdır. Tip 1 DM'de ilk 5 yılda genellikle görülmez, Tip 2 DM vakalarının bir kısmında tanı sırasında bulunabilir. Tedavinin şekillendirilmesi düzenli göz takiplerine göre yapılmaktadır. Diyabetik retinopati temel olarak retina kapillerlerinin hastalığıdır, bazal membran kalınlaşması, perisit adı verilen (retina kapillerlerinin destek hücreleri) hücrelerin kaybı ve mikroanevrizmalar ilk bulgularıdır. Hiperglisemi perisit kaybı ve endotel hasarına yol açar. Diyabetik nöropati DM'li bir hastada periferik duyuşal, motor ve otonom sinir liflerinde diffüz veya lokal hasar meydana getiren kronik bir komplikasyondur [22]. Diyabetik ayak gelişiminde nöropati varlığı önemlidir, çünkü nöropati acıya duyarlılığı azaltır, küçük yara ve kesiklerin farkedilmemesine yol açar. Ayaklardaki nasır, kesik, çizik gibi problemlerin önlenememesi enfeksiyonun ilerlemesine, hipergliseminin kontrol altına alınamamasına, sonuç olarak ekstremitte amputasyonlarına neden olabilmektedir. Diyabetlilerde alt ekstremitte amputasyonları diyabeti olmayanlara nazaran 10-15 kat fazladır. Diyabetik ayak yarası gelişme riski yüksek olan diyabetlilerin yakın takibi yapılmalıdır.

Bireyin ayağındaki basıncı azaltacak önlemler alması ve özel ayakkabı kullanması yaranın ülserleşmesini önleyebilir. Hipertansiyonun diyabetle birlikte görülmesi oldukça sık olup diyabetik hastaların yaklaşık %20-60'nı etkilemektedir. Diyabetik hastalarda hipertansiyonun kontrolü ile ilgili çalışmalar, kan basıncının düzenli kontrolü kardiyovasküler ve ölüm açısından önemli risk azalması sağladığını göstermiştir [33]. Birçok ülkede, kardiyovasküler hastalık ya da dolaşım sistemi hastalığı diyabetli kişiler arasında en başta gelen ölüm sebebidir. Diyabetli kişilerde kalp hastalığı ya da inme riski 2-5 kat daha fazladır. Bacaklardaki damarlar da etkilenir ve bu nöropatiyle beraber amputasyona yol açabilir.

Diyabet periferik ve merkezi sinir sisteminde yapısal ve fonksiyonel hastalıklara neden olur [36]. Öğrenme ve hafıza bozulması diabetes mellituslu erginlerde gözlemlenmiştir [37]. Diyabet kronik hiperglisemi yoluyla bilişsel bozukluklara yol açar. Diyabetik hastaların beyinlerinde elektrofizyolojik ve yapısal anormallikler vardır ki bunların bilişsel bozukluklarla bağlantılı olduğu bilinmektedir [6,38].

1.4.Deneysel Diyabet ve Serbest Radikaller:

Diyabetin ortaya çıkışında oksidasyonun rolü olduğuna dair bulguların çoğu deneysel diyabette kullanılan iki ilaç olan alloxan ve STZ ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Bu kimyasal maddelerin her ikisi de oksidan madde meydana getirerek Langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip ederler. Hücre tarafından yeterli miktarda tutulan alloxan, askorbat ve tiollerle reaksiyona girerek onların antioksidan etkilerini engeller ve oksidanların üretimi ile β hücre hasarına neden olur. Bir glukonitrozure olan STZ'nin etki mekanizması ise daha az anlaşılmıştır. Ancak STZ'nin uygun olmayan NO cevapları meydana getirdiği, NO cevabının neden olduğu adacık hücre yıkımının artmasının diyabeti oluşturduğu düşünülmektedir. DM'un başlangıcında sıklıkla pankreas adacık hücrelerinde inflamasyon vardır ve bu insülitiste fagositlerden salınan serbest radikaller önemli rol oynar. Sitokinler de β hücrelerinde serbest radikallerin oluşumuna yol açarlar [39]. STZ ilişkili diyabet, Tip-1 diyabet için bir deneysel model olarak karakterize edilir ve endojen kronik stresin örneğini sağlar [40].

STZ ilişkili diyabette ilerlemiş yapısal ve fonksiyonel anormalliklerin hem periferik hem de merkezi sinir liflerinde meydana geldiği tanımlanmıştır [41, 42]. Oksidatif stres diyabetik komplikasyonlar ve diyabetin altında yatan bir mekanizma olarak değerlendirilir. Serbest radikaller sürekli olarak çevresel uyarılarla etkileşim ve normal metabolik sürecin sonucu olarak vücutta üretilir. Fizyolojik şartlar altında antioksidanların büyük bir bölümü canlı ortamda serbest radikal üretiminin olumsuz etkilerine karşı vücudu korur [43]. Oksidatif stres, radikal üretimi ve radikal yok edici sistem arasındaki bir dengesizlikten kaynaklanır. Örneğin; serbest radikal üretiminin yükselmesi veya antioksidan aktivitenin düşmesi ki her iki durumda da oksidatif stres meydana gelebilir. Diyabetlilerde protein glikasyonu ve glukoz otooksidasyonu sonradan lipid peroksidasyonunu katalizleyen serbest radikaller üretebilir [11,43]. Bunların yanı sıra diyabetlilerde antioksidan savunma sisteminin bozuklukları; antioksidan enzimlerde değişiklik, bozulmuş GSH mekanizması ve azalmış askorbik asit seviyeleri ile gösterilmiştir [44]. Ancak canlı ortamda yüksek oksidatif stres asla açık olarak gösterilememiştir. Tiyobarbütürik asit analiz maddesi kullanılarak hayvan ve insan modellerinde yapılan çalışmalarla, diyabetik yapıda lipoproteinler ve membranlarda LPO'nun yükselmiş olduğu gösterilmiştir [35].

Oksidatif strese sebep olan serbest radikal gruplarından biri Reaktif oksijen türleri (ROS)'dir. ROS diyabetlilerde yükselir. Bunun ana kaynakları glukoz otooksidasyonunun ve metabolitlerinin dahil olduğu metabolitlerdir. Bunların yanısıra ilerlemiş glikasyon, değişken prostanoid üretimi ve anormal veya etkisiz mitokondriyal fonksiyon vardır [45, 46]. Periferik sinirler için ROS direkt olarak nöronları ve Schwann hücrelerini tahrip edebilir ve diyabet ile birlikte antioksidan koruma mekanizmalarını tehlikeye atar. Bu yüzden diyabetik ratlarda siyatik sinir LPO'nu yükselmiştir ve süperoksit dismutaz seviyeleri ve indirgenmiş GSH formu, GSH peroksidaz ve redüktazda bir değişiklik olmamasına rağmen azalmıştır [47]. Daha uzun bir dönemde bu dorsal sinir kökü gangliyonlarında son zamanlarda gözlemlendiği gibi onların mitokondrileri ve hücre yapıları üzerine kötü etkilerinin yanı sıra, demiyelinizasyon ve aksonapati gibi kümülatif nörodejeneratif değişikliklere yol açabilir [48]. ROS ayrıca periferik sinirlerin de dahil olduğu, birçok organın perfüzyonunu sağlayan damar fonksiyonları üzerine de etki yapar. Bu etki, deneysel modellerde sinir fonksiyonunda en başta beliren bozukluklardan sorumludur. Nitrik oksit , ROS için önemli bir vasküler hedeftir.

Süperoksit NO'ı nötralize eder ve peroksinitrit formu endotel tahribine sebep olabilen hidroksil radikallerinin bir kaynağıdır. Bu yüzden oksidatif stres, hiperglisemiye akut maruz kaldıktan sonra bile bazı deneysel preparatlarda açıkça görülen vasküler endotele bağlı gevşemeyi azaltır [49].

Kontrol edilmeyen hiperglisemili diyabet hastalarında kardiyovasküler hastalıklar, retinopati, nefropati ve nöropati riski daha yüksektir. Bu hastalıkların bazıları genetikdir, diğerleri membranın glikasyonunun yükselmesi, sorbitol akümüasyonu ve hiperglisemi tarafından sebep olunan aldoz redüktazın aktivasyonu ile bağlantılı olabilen bazı proteinlerle ilişkilidir. Protein glikasyonu, lipoproteinlerin oksidasyonu, trombosit kümeleşmesi ve kanın hiperkoagülabilesi gibi risk faktörleri bir ölçüde hipergliseminin direk sonuçlarına ve DM'da vasküler hastalıkların gelişmesine farklı derecelerde katkıda bulunurlar [50]. Oldukça önemli bir metabolik düzensizlik olarak bilinen ve hiperglisemi ile karakterize edilen diyabet olgularında serbest radikal oluşumunda artış olmaktadır. Diyabette serbest radikal üretiminin arttığı ve radikal bağlayıcı sistemlerde azalma olduğu ileri sürülmüştür. Bu gelişmeler diyabet komplikasyonlarının patogeneğinde serbest radikallere olan ilgiyi arttırmıştır [32].

1.5.Fitoterapi:

Geleneksel olarak uzun yıllardan beri bitkilerle tedavi insan hayatının ayrılmaz bir parçası olmuştur. Halk hekimliği olarak isimlendirilen bu durum kimi zaman modern tıbbın bile çare bulamadığı hallerde bitkilerle tedaviye başvurularak olumlu sonuçlar alınmıştır [51]. Asırlardan beri değişik ülkelerde değişik şekillerde farklı sırlarla veya terkiplerle o hastalığa uygun, özellikle o insanın organ yapısına ve kişisel özelliklerine göre bitkilerden yararlanma yoluna gidilmiştir. Her bitkinin kendine has özelliklerinin olduğu bilinen bir gerçektir. Tedavilerde insan organ özelliklerinin bilinmesi kadar, bitki özelliklerinin de bilinmesi çok önemlilik arz etmektedir [52].

DM serbest radikallerin arttığı ve/veya antioksidan mekanizmaların inhibe olduğu oksidatif stres durumlarından birisidir. Çeşitli yayınlarda bazı antioksidan enzimlerin azaldığı, arttığı veya değişmediği rapor edilmişse de araştırmacıların kesinlikle fikir birliğine vardıkları konu, diyabette lipid peroksidasyonunun arttığı ve antioksidan mekanizmaların bozulmuş olduğudur. Bu yüzden diyabet tedavisinde antidiyabetiklere ek olarak antioksidan maddelerin veya antioksidan özellikleri olan antidiyabetiklerin kullanılması oksidatif stresle başa çıkabilmek için tavsiye edilmektedir [1].

Günümüzde diyabetin kontrolünü sağlamak ve komplikasyonlarını azaltmada artık alternatif tedavilere ihtiyaç duyulduğu gözlenmiştir. Türkiye'deki etnobotanik çalışmalar çeşitli bitkisel çareler fitoterapiler özellikle antioksidan etki gösteren [soğan (*Allium cepa*), sarımsak (*Allium sativum*), gurmar (*Gymnema sylvestre*), çemenotu (*Trigonella foenum*) salt bush (*Atriplex halimu*), yaban mersini (*Vaccinum myrtillus*), japon eriği (*Ginkgo biloba*), ginseng ve nar çiçeği gibi] bitkilerin kullanımı diyabetin semptomlarını hafiflettiğini göstermektedir. Örneğin 10 yılı aşkın bir süredir narın farmakolojik mekanizmaları konusunda önemli aşamalar sağlanmıştır [53]. Narın meyvesinin ve bütün kısımlarının tedavi edici özelliklerinin olduğu bulunmuş ve bunun yanı sıra kabuğunun, köklerinin ve yapraklarının da tıbbi açıdan önemli özellikler gösterdiği bulunmuştur [54]. Genel olarak narın en önemli tedavi edici bileşenlerinin ellagic acid, ellagitaninler (punicalaginler), punicic acid, flavonoidler, anthocyanidinler, anthocyaninler ve estrogenik flavonoller, flavenler ile polifenolik bileşikler olduğunu belirtilmektedir [55,56].

Diyabetin tedavisinde ve önlenmesinde pek çok tıbbi bitki kullanılmaktadır. Antioksidan etki gösteren ve tıbbi bitki litaretüründe yer alan günümüzde önemi gittikçe artan tedavi edici etkiye sahip bir meyve Punicaceae familyasından *Punica granatum* (Nar) meyve suyunun, meyve ve kabuk ekstraktlarının çekirdeklerinin tohum yağları, tohum ekstraktlarının ve çiçeğinin önemli oranda antioksidan özelliğe sahip olduğu bulunmuştur [57].

1.6. Nar (*Punica granatum* L.):

Punicaceae familyasından içinde küçük çekirdekler ve meyve gövdesini oluşturan yüzlerce tanecikten oluşmuş, hafif ekşi tadında ılıman iklimler de yetiştirilen bir meyve türüdür. Akdeniz bölgesinden Japonya'ya, öte yanda ABD'nin güneyi ile Güney Amerika Kıtasına kadar yayılmış olup kimi yerde meyvesi için, kimi yerde süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Ülkemizde Ege ve Akdeniz bölgelerinde bolca, ayrıca iklimi uygun olan diğer bazı yerlerde de yetiştirilir. Haziran-Temmuz aylarında kırmızı renkli çiçekler açan, iki ile beş metre boylarında ağaççıklardır [58].

Bazen dikenli, yaprak dökken çalı veya ağaçlardır. Yapraklar basit, tam kenarlı, karşılıklı dizilişli ve stipulasızdır. Çiçekler tek başına erdişi, epigin ve aktinomorf simetridir. Sepal sayısı 5-7 adettir, petal sayısı 5-7 adet serbesttir, tomurcuk halindeyken kiremit dizilişlidir. Stamenler çok sayıdadır. Ovaryum alt durumlu, çok gözlü, gözler üst üste, üstteki eksensel, alttaki çeperseldir. Çok sayıda ovül vardır. Çiçek eksenini çukurlasan hipantiyum meydana getirir. Meyve büyük, ekzokarp ve derimsidir. Tohumlar çok sayıda her biri meyve etiyle sarılı durumdadır. *Punica* L. cins özellikleri familya özellikleri ile aynıdır. Gövdeleri gayri muntazamdır. Yapraklar karşılıklı, kısa saplı ve kırmızı kenarlıdır.

Çiçekler kısmen sapsız, tek tek ve birkaçı bir arada bulunur. Çanak yaprakları kırmızı renkli, dökülmeyen ve etlidir. Meyveleri küre şeklinde ve portakal büyüklüğünde, önceleri yeşil, olgunlukta kırmızımsı renkte, derimsi kabuklu, çok tohumlu ve etlidir. Nar çok yıllık, çalı formunda bir bitki olup çok kuvvetli bir kök sistemine sahiptir. Bitki çok gövdeli ve sık dallıdır. Çiçekleri erkek-dişi ve erdişi olup küre şeklinde iri bir meyvesi vardır.



Şekil 1. Nar (*Punica granatum* L.)

Üstten hafif basık olan bir ılıman iklim bitkisidir. Nar, C vitamini, demir ve potasyum yönünden zengin bir meyvedir. Tadı: Tatlı, mayhoş, ekşi gibi çeşitlidir. Nar bitkisinin adaptasyon kabiliyeti yüksektir. Genelde tropik ve subtropik iklim bitkisi olmasına rağmen, -10 °C'ye kadar dayanabilmektedir [59].

Nar şifalı bitkiler litaretüründe yer alır. Genellikle besleyici ve tedavi edici ilaç olarak ağız yoluyla çeşitli karışımlarla birlikte yenilir ve içilir haricen de merhem olarak kullanılır. Onun sadece meyvesi değil, çiçeği, çekirdekleri, suyu ve kabukları da çeşitli karışımlar halinde tıbbi olarak kullanılır. Nar cennet meyvesi olarak ta nitelendirilir. İslami litaretürler de “ Her narda bir damla cennet suyu vardır.” denilmektedir. Ayrıca narı içindeki zarı ile beraber yiyin çünkü mideyi temizler denilmiştir.



Şekil 2. Nar (*Punica granatum* L.) Çiçeği

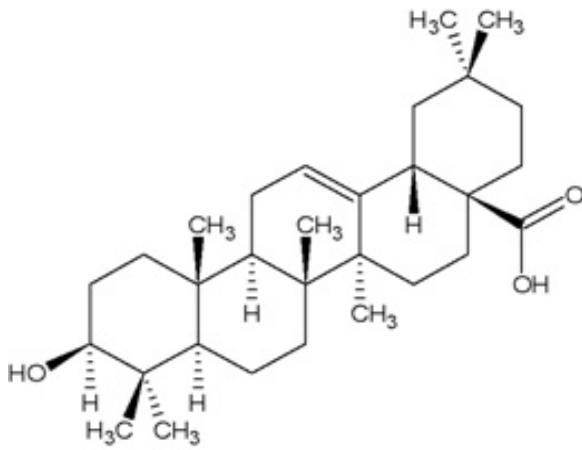
1.6.1.Nar (*Punica granatum* L.) Çiçeği

Çiçekleri, meyvelerinin ortasından çıkar ve 5 parçadır. Genellikle 3 cm çapındadır ve kalın, boru şeklinde, kırmızı çanaklı gibi şekillerde sınıflandırılırlar. Çiçeklenme dönemi, mayıs-haziran aylarıdır. Genelde, 50-70 gün çiçekli kalır. Sıcak ve güneşli yörelerde, zengin çiçek oluşturur [61].

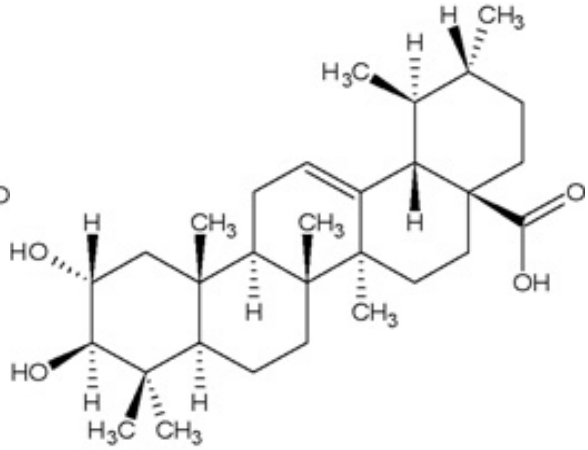
Punica granatum L. çiçeğinin metanolik ekstresinde, pelargonidin 3,5 diglikozit, ursolik asit, uroluk asit, daukosterol, oleonikasit, brevifolinkarboksilat, pomegranatat, sitosterolile maslinik asit, asiatic asit ve alkan yapısında maddeler izole edilmiştir. Petrol eterli ekstresinde, sitosterol ve ursolik asit; kloroformlu ekstresinde bu ana bileşenler yanında maslinik asit, asiatic asit, sitosterol- β -D-glukozit; etil asetat ekstresinde 3,3',4'-tri-

O-metilelajik asit, daukosterol, urolük ve maslinik asit; aseton ekstresinde etil brevifolinkarboksilat; etanolü ekstrede ise D-mannitol, elajik asit ve gallik asit, petrol eteri ekstresinde epikateşin, kateşin ve yine gallik asit, elajik asit bulunduğu saptanmıştır [59,60, 62]. *Punica granatum* L. çiçeği üzerinde yapılan çalışmalar sonunda elde edilen kimyasal maddeler sırasıyla incelenmiştir ve yapılarına göre gruplandırılarak açıklanmıştır [60].

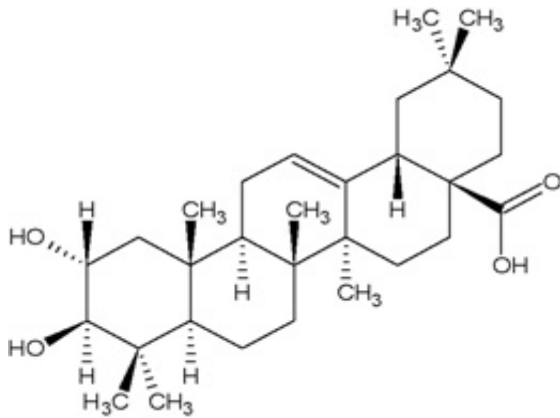
1.6.1.1.Triterpenler



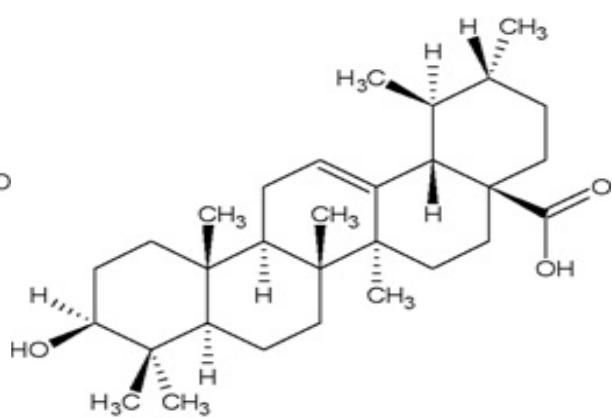
• **Oleonik asit**



• **Maslinik asit**



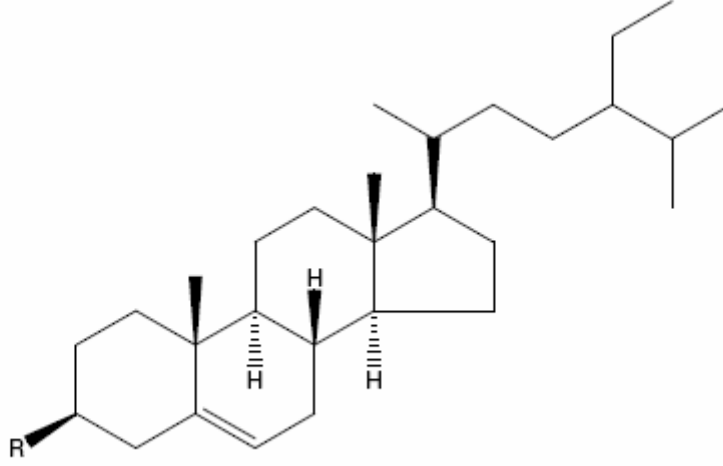
• **Asiatik asit**



• **Ursolik asit ***

* Tohumda da bulunur.

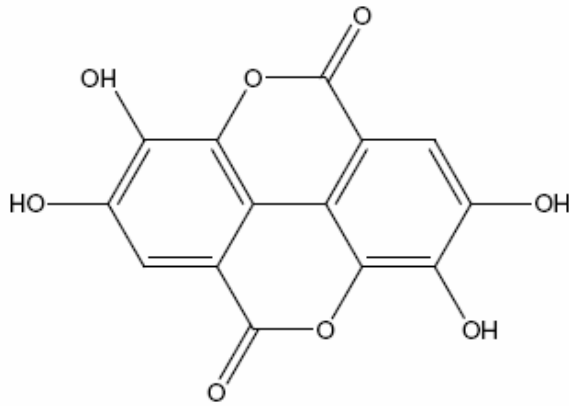
1.6.1.2.Stereoidler



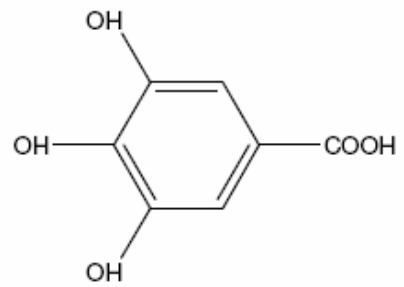
R= H □-sitosterol

R= Glu **Daukosterol**

1.6.1.3.Hidroksibenzoik asitler:



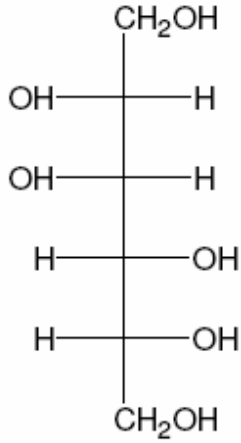
***Elajik asit**



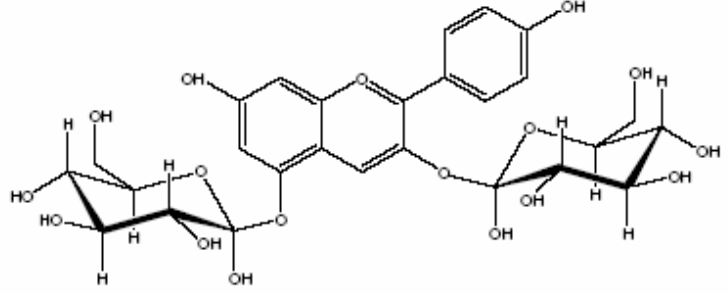
***Gallik asit**

* Elajik asit meyve suyunda, meyve kabuğunda ve tohumda, Gallik asit meyve suyunda ve meyve kabuğunda da bulunur.

1.6.1.4. Diğer Bileşikler:



D-Mannitol



Pelargonidin 3-5 diglikozit

Nar çiçeğın yüksek miktarda polifenol içerdđđ ve güçlü antioksidan aktivitesinin bunlardan kaynaklandıđđ bulunmuştur. DPPH sistemde %81,6 antioksidan aktivite göstermiştir. ROS ve RNS türevleriyle yapılan *in vivo* hayvan deneylerinde reaktif oksijenden ileri gelen doku hasarını iyileştirdđđ gözlenmiştir [14].

Punica granatum L. çiçeđđ ekstresinin şeker hastalıklı şışman (ZDF) farelerde yapılan deneylerde Peroksizom arttırıcı reseptörü (PPAR)- α uyararak kardiyak lipid alınımını inhibe ettiđđ ve sirkülasyonunu azalttıđđ böylece yükselen kardiyak yağ asitlerini düşürdüđđ bulunmuştur [63]. *Punica granatum* L. çiçeđđ metanol ekstresinin (500 mg/kg günlük) 6 hafta oral uygulanmasıyla insülin reseptörünün duyarlılıđđnı arttırarak plazma glukoz seviyesini düşürdüđđ gözlenmiştir [64]. Diğer bir çalışmada normal ve alloksanla indüklenen diabetli farelerde *Punica granatum* L. çiçeklerinin sulu-etanollü ekstrelerinin (% 50), önemli ölçüde kan glukozunu düşürdüđđ gözlenmiştir [65].

1.7.Hipokampus:

Hipokampus, serebral korteksin değişik bir tipinden oluşan uzunca bir yapıdır. Gerçekte, temporal lob korteksin bir bölümünün, yan ventrikülünün ventral yüzünü oluşturmak üzere içeriye doğru katlanmasından ibarettir. Hipokampusun bir ucu amigdaloid nükleuslara dayanır, kenarlarından biriyle de temporal lobun ventromedial korteksi olan parahipokampal girusla kaynaşır.

Hipokampusun, serabral korteks bölümlerinin çoğu ile olduğu kadar, limbik sistemin temel yapıları olan amigdaloid, hipotalamus, septum ve korpus mamillare ile de sayısız bağlantısı vardır. Hemen her tip duyuşsal algı, anında hipokampusun çeşitli bölümlerinin aktivasyonuna neden olur ve hipokampus bir çok çıkış sinyallerini, hipotalamus ve limbik sistemin öteki bölümlerine dağıtır, özellikle en büyük çıkış yollarından biri fornixe gider. Böylece hipokampus da, amigdaller gibi duysal giriş sinyallerinin uygun limbik reaksiyonları doğuracak ek bir kanaldır.

Hipokampusun bir başka özelliği de, çok zayıf elektriksel uyarıların, stimölasyonu kesildikten sonra saniyelerce devam eden lokal epileptik nöbetler meydana getirmesidir. Bu durum, hipokampusun normal fonksiyon durumlarında bile uzun süren sinyaller verebileceğini düşündürmektedir [66]. Hipokampal epilepsi sırasında kişi çeşitli psikosomatik etkiler algılamaktadır. Bunlar arasında; koklama, görme, işitme, dokunma ve başka tipte halüsinasyonlar bulunur. Kişi bilincini kaybetme ve bu halüsinasyonların gerçekte dış olduğunu bilse bile, bunları bastıramaz, kontrol edemez. Hipokampusun bu aşırı duyarlılığının nedenlerinden biri belki de, beynin başka bölgelerindeki korteksten farklı olarak altı tabaka yerine ancak üç normal tabakası olan bir korteks tipinde olmasıdır.

Hipokampus, epilepsinin tedavisi amacıyla birkaç vakada cerrahi olarak çıkarılmıştır. Bu şahışlar daha önce öğrenmiş oldukları aktivitelerin çoğunu yeterli bir şekilde yapabilirler. Bununla beraber hemen hemen yeniden hiçbir şey öğrenemezler. Gerçekten kendileriyle her gün birlikte olan kişilerin bile isimlerini veya yüzlerini öğrenemezler. Ancak bir an için ya da aktiviteleri sırasında ne olduğunu anımsayabilirler. Böylece, yalnız kısa süreli primer bellekleri vardır. Bunlarda uzun süreli sekonder bellek oluşturma yetenekleri tamamen ya da büyük ölçüde ortadan kalkmıştır. Bu durum anterograd amnezi olarak isimlendirilmiştir.

Hipokampusun bozulması, daha önce kazanılmış bellekte de bazı eksikliklere yol açar, yakın zamanlara ait bellek, uzak geçmişe göre biraz daha kuvvetlidir. Hipokampus olfaktor korteksin bir parçası olarak gelişmiştir. En aşağı sınıf hayvanlarda, hangi besinlerin yenileceği, belirli objelerin kokusundan tehlikeli olabilecekleri, kokunun seksüel bakımdan davet edici olup olmadığını belirlemede ve hayati önem taşıyan öteki birçok kararların alınmasında önemli rol oynar. Böylece, beynin en erken gelişiminde, hipokampus kritik karar verici nöronal mekanizmayı oluşturarak, giriş sinyallerinin önemli tiplerini ve önem derecelerini belirleme fonksiyonunu yürütür. Belki de beyinin öteki bölümleri geliştikçe, öteki duysal alanlardan hipokampusa gelen bağlantılar bu karar verme yeteneği ile ilgili rolü devam ettirmektedir.

Hipokampusun, kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe çevrilmesine neden olan dürtüyü sağladığı ileri sürülmüştür. Yani bazı tip sinyalleri kalıcı deponun yer aldığı uzun süreli belleğin depo alanlarına taşır. Mekanizma ne olursa olsun, hipokampus olmadan, uzun süreli belleğin pekiştirilmesi mümkün olmamaktadır [67].

Öğrenme ve hafıza, limbik sistemde dahil olmak üzere, merkezi sinir sisteminin birçok bölgeleri ile ilgili kompleks fonksiyonlardır. Yeni edinilen bilgilerin depolanmasında hipokampusun önemli rolü olduğu bilinmektedir. Hipokampus'u etkileyen lezyonu olan hastalarda kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülmediği gözlenmiştir. Lezyonun sol hipokampusta olduğu durumlarda daha çok sözel hafıza etkilenirken, sağda olduğu durumlarda ise görsel hafıza etkilenmektedir [68].

Her türlü duysal algı, anında hipokampusun çeşitli bölümlerini aktive eder. Korteks ile alt sinirsel oluşumlar arasında algılama, limbik sistem, soyut düşünme ve algılama, öğrenme, hafıza (data, depolama), uzaysal hafıza gibi verilerin aktarılmasında hem köprü hemde kavşak rolü oynar [69].

1.8. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, biyolojik sistemlerde prooksidan ve antioksidan dengesinin bozulması olarak tanımlanabilir. Bu denge bozulduğunda, serbest radikaller ve serbest radikallerden türeyen non-radikal reaktifler hücrelerdeki makromoleküllerde oksidatif hasar oluşturur; böylece genler, proteinler, yapısal karbonhidratlar ve lipidlerde yapı-fonksiyon bozulması meydana gelir. Oksidatif stres akut ve kronik birçok hastalığın patogeneğinde asli rol oynar [70,71]. Bu reaktiflerin yüksek konsantrasyonlarda zararlı etkileri olsa da ‘ılımlı’ konsantrasyonlarda, fizyolojik anlamda önemli regülatuar rolleri vardır. NO ve ROS bazı canlı sistemlerinde diğer fizyolojik fonksiyonlar için sinyal başlatıcı (signalling) özelliklere sahiptir. NO vasküler tonus düzenlenmesindeki rolü, ROS’un doku oksijen durumunun (doku oksijen basıncının) bir göstergesi olarak ventilasyonun ve eritropoietin sentezinin kontrolü örnek olarak verilebilir [70].

Biyolojik sistemlerde oksidasyon daha çok serbest radikaller aracılığıyla oluşmaktadır. Serbest radikaller yörüngelerinde eşlenmemiş elektron taşıdıklarından unstabildirler; bu nedenle diğer moleküllerle kolaylıkla reaksiyona girebilirler [72,73].

Süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali, hidrojen peroksit, singlet oksijen, CCl_4 , NO ve fenilhidrazin radikali ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}=\text{N}$), tiyol bileşikleri (R-SH), vücutta bulunan bazı metaller biyolojik sistemlerde oksidasyon reaksiyonlarında yer alırlar [74, 75].

Biyolojik sistemdeki (ROS) en önemli kaynağı aerobik metabolizmadır. Reaktif oksijen türleri radikaller ve non-radikaller şeklinde gruplanabilir. Radikal olmayan oksijen türlerinin yörüngelerinde elektron eksikliği yoktur ve radikallere göre daha zayıf oksidanlardır [70].

Biyolojik sistemde oksidan maddelerin tehlikeli şekilde yükselmesini engelleyen ve oksidasyon-redüksiyon homeostazının sağlanmasına katkıda bulunan çeşitli enzim ve maddeler vardır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-S-transferaz (GST), mitokondrial sitokrom oksidaz, hidroperoksidaz, seruloplazmin, transferin, ferritin, hemoglobin, miyoglobin, vitamin E, C, A, melatonin, GSH, NAC, ubiquinon, selenyum. Burada belirtilenler dışında çok sayıda endojen ve eksojen antioksidan keşfedilmiştir [70,71,73].

1.9.Öğrenme ve Bellek:

Hayvanlara ve özellikle insana ait bir nitelik, davranışını deneyimlere göre değiştirebilme yeteneğidir. Öğrenme bunu gerçekleştirebilmek için bilgi kazanabilme, bellek bu bilgiyi koruma ve depolamadır. Açıkça görüleceği gibi bu iki olay birbiri ile yakından ilişkilidir ve her ikisinin birlikte ele alınması gerekir.

Fizyolojik bakış açısından bellek, net (eksplisit) ve gizli (implisit) olarak iki tipe ayrılabilir. Tanıma belleği veya deklaratif bellek olarak da adlandırılan net bellekte, bilinç eşleniktir ve hipokampus ile beyinin medial temporal loblarının diğer bölümlerinde depolamaya bağlıdır. Olaylara (epizodik) ve sözcük, kural, dile ait (semantik) bellek olarak alt gruplara ayrılır. Gizli bellek uyanıklığı içermez ve buna varlığı anlaşılmayan veya refleksif bellek de denir. Bunun depolanması, en azından bazı durumlarda, hipokampusta işlemlemeyi içermez ve diğer şeylerin yanı sıra, beceri, alışkanlık ve koşullu refleksleri kapsar. Öte yandan, bisiklet sürme gibi etkinlikler, tam olarak öğrenilinceye kadar başlangıçta tanıma belleği oluşturup daha sonra refleksif belleğe geçer [32].

Eksplisit bellek ile implisit belleğin çeşitli formları şunları içerir:

- Saniyeler ile dakikalar boyu süren, bu sırada hipotalamustaki veya başka yerlerdeki işlemlerin, kavşak etkinliğindeki uzun süreli değişikliğe dayandığı kısa süreli bellek,
- Belleğin yıllarca ve bazen yaşam boyu depolandığı uzun süreli bellek.

Kısa süreli bellek sırasında anı kalıntıları travmalar ve çeşitli ilaçlarla bozulabilir, halbuki uzun süreli anı kalıntıları bozulmaya belirgin şekilde dirençlidir. Çalışan bellek, kişi bir bilgiye dayanan girişim planlarken bilgiyi hazır tutan kısa süreli bir bellek tipidir.

İmplisit bellek, bir kez kazanıldıktan sonra bilinçsiz ve kendiliğinden gerçekleşir hale geçen beceri ve alışkanlıkları kapsar. Bu bellek, daha önce karşılaşmış olma sonucu sözcük veya cisimlerin tanınmasını kolaylaştıran durumu da içerir. Bunun bir örneği, ilk birkaç harfin söylenilmesi sonucu bir kelimenin daha kolay hatırlanmasıdır. İmplisit belleğin diğer çeşitleri, asosiyatif olan ve olmayan formlara ayrılabilir. Asosiyatif olmayan öğrenmede organizma tek bir dürtü ile öğrenirken asosiyatif öğrenmede organizma bir dürtünün diğer dürtü ile olan ilişkisini öğrenir.

Alışkanlık (habitüasyon), nöral bir uyarının defalarca yinelendiği basit bir öğrenme şeklidir. Bir uyarı ilk kez uygulandığında, o canlı için yeni olup bir tepkime uyandırır. Bu uyarı yinelenerek olursa, giderek daha az elektriksel cevap oluşturur. En sonunda denek uyarana alışır ve buna aldırış etmez. Duyarlanma (sensitizasyon) bir anlamda bunun tersi olan bir olaydır. Yinelenen uyaran, eğer hoş veya hoş olmayan bir başka uyaranla bir veya daha fazla birlikte verilirse daha büyük bir cevap meydana getirir. Uyarıların uyandırma değerinin benzeri yoğunlaşmasının insanda meydana geldiği bilinmektedir. Çeşitli tür gürültüler arasında uyuyan annenin bebeği ağlayınca hemen uyanması buna örnektir. Alışkanlık asosiyatif olmayan bir öğrenme örneğidir. Asosiyatif öğrenmenin klasik örneği koşullu reflekstir. Koşullu bir refleks, önceden cevap oluşturmeyen veya çok hafif bir cevap oluşturan bir dürtüye karşı, bu dürtünün, bu cevabı normal olarak uyandıran bir diğer dürtüyle tekrar tekrar eşleştirilmesiyle kazanılan bir refleks cevaptır [76].

Bellekte kilit öge, seçilmiş kavşak bağlantıların gücünde değişiklik olmasıdır. En basit olanlar hariç bütün bellek biçimlerinde, bu değişiklik protein sentezini ve genlerin etkinleştirilmesini içerir. Bu olay, kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe geçiş sırasında görülür. Hayvanlarda, her eğitim oturumunu izleyen beş dakika içinde anestezi uygulanır, elektroşok verilir veya protein sentezini bloke eden ilaç, antikor veya oligonükleotidler kullanılırsa, uzun süreli öğrenilmiş cevapların kazanılması önlenir. Bu girişimler, eğitim oturumlarından dört saat sonra yapılırsa kazanım üzerine herhangi bir etki görülmez. İnsanda bu olayların karşılığı, beyin sarsıntısı veya elektroşok tedavisinden hemen önce gerçekleşmiş olaylara ait belleğin yitimidir (retrograd amnezi). Bu amnezi, deney hayvanlarındakinden daha uzun dönemleri kapsarsa da uzak bellekler el değmemiş olarak kalır [32].

Hafıza ve öğrenme yaşla bağlantılı nörodejeneratif hastalıklarla bozulur. Bu hastalıkların belirli bölgelerde reaktif oksijen türlerinin aşırı bulunmasının bir sonucu olduğuna inanılır. Beyin, radikal oksijen oluşumunun nisbeten yüksek olması, kolaylıkla okside olabilen lipidlerin yüksek konsantrasyonlarda varlığı ve antioksidan savunma sisteminde nisbeten olan eksiklik yüzünden oksidatif strese hassastır [77-79].

1.10.Oksidatif Stresin Hafıza ve Öğrenmeye Etkisi

Hafıza ve öğrenme yaşla bağlantılı nörodejeneratif hastalıklı kişilerde bozulur. Yaşla birlikte insan anlayışının nörolojik karışıklıklar tarafından takip edilen dejenerasyonuna sinir sisteminin oksidatif tahribi tarafından sebep olunabileceği düşünülmüştür. Beyin ve sinir sisteminin, fazla miktarda oksijen kullanan lipid bakımından zengin nöral parankimadan yüksek oranda içermesi ve düşük antioksidatif enzimlere sahip olmaları yüzünden peroksitlerin tahribine karşı diğer dokulardan daha fazla hassas oldukları düşünülmektedir [80,81]. Beynin yaşlanmasıyla ilgili son çalışmalarda Alzheimer hastalığının yanısıra normal olarak beyin yaşlanması boyunca oksidatif tahribin arttığı gösterilmiştir [82,83]. Motor fonksiyonları ve bilişsel kontrol için düşünülen serebral korteks ve hipokampus oksidatif strese oldukça hassas olarak görülürler ve antioksidanlara ihtiyaç duyarlar [84]. Oksidatif strese maruz kalan ratlarda, serebral korteks ve hipokampusun sinapslarında süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesinin normal ratlarla karşılaştırıldığında yükseldiği, katalaz aktivitesinin düştüğü rapor edilmiştir [85]. Deneysel olarak meydana getirilmiş oksidatif stresle serebral korteks ve hipokampusun tahribiyle neden olunan nörodejenerasyonu engellemek için melatonin ve vitamin E gibi antioksidanların kullanımının önemi tespit edilmiştir [13,43,86,87]. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ratlarda oksijen eksikliği durumunda elektron mikroskopuyla gözlemlenen değişikliklere sinaptik veziküllerin normal olmayan akümüasyonu, sinir hücre çekirdeklerinin deforme olması ve şişmiş mitokondriler gibi örnekler verilebilir. Bu bulgular nörotransmisyon fonksiyonunda bir eksikliğin olduğuna işaret eder [82,88].

Hiperglisemi ile uyarılan oksidatif stres, diyabetin en sık gözlemlenen komplikasyonlarından biri olan diyabetik nöropatinin gelişmesini sağlar [89,90]. Serbest radikaller, lipid, nükleik asit, karbohidrat gibi biyolojik makromoleküllerle etkileşirler ve oksidatif strese sebep olarak diyabetle bağlantılı nöropatolojiye katkıda bulunan nöronal ölümü meydana getirirler [90,91]. Diabetes mellitus'ta antioksidan kullanımı ve oksidatif stresin rolleri çok sık olarak çalışılmıştır [92].

1.11.Diyabetik Ratlarda Öğrenme Eksiklikleri

Diyabetle birlikte ortaya çıkan oksidatif stres, hafıza ve öğrenme bozukluklarına yol açar. Bu olaya serbest radikallerin etkisi büyüktür. Eğer diyabetin başlangıcında insülin pelletlerinin subkutan implantasyonu yapılırsa kan glukoz seviyeleri 25 mmol'den normal seviyesine (7 mmol) düşürüldüğü için tamamıyla öğrenme eksiklikleri önlenmiş olur. Ama bu uygulamaya diyabet uyarısından 10 hafta sonra başlanırsa ki bu zaman öğrenmenin bozulmuş olduğu zaman aralığıdır, bu durumda sadece az miktarda gelişme vardır. Morris water-maze performansında yaşlı ratlarda görülen bazı bozukluklar, diyabetik serebral fonksiyon bozukluğu ve yaşlanma arasında bir etkileşimin var olduğunu göstermiştir ki bu bozukluklar genç-ergin ratlarda umulan etkilerden daha büyüktür [93]. STZ ilişkili diyabetik ratlarda diyabet uyarısından 10 hafta sonra Morris water maze testinde öğrenme eksiklikleri görülmeye başlamıştır [93,94]. İşin uzaysal versiyonuna bakıldığında ise diyabetik ratların Morris water maze testinde son eğitimlerinde bile ısrarla havuzun kenarlarına kaçmaya teşebbüs ettikleri yapılan çalışmada gözlemlenmiştir. Ancak diğer taraftan kontrol ratları böyle bir davranış sergilememişlerdir. Bu, diyabetik ratların kontrollerden daha düşük düzeyli öğrenme yeteneğine sahip olduğuna işaret eder [94].

1.12.Glutatyon (GSH):

GSH (γ -glutamil-sisteinil-glisin) memeli hücrelerinde en çok bulunan antioksidan ve GSH/glutatyon disülfid (GSSG) de hücrelerdeki majör redoks çiftidir. GSH antioksidan savunma sisteminde, besin metabolizmasında, gen ekspresyonu, DNA ve protein sentezi, hücre proliferasyonu ve apoptozis, sinyal transdüksiyonu ve daha başka hücrel olaylarda yer alır [95, 96].

Glutatyon, organizmanın tüm hücrelerinde bulunan, hücrenin protein yapısı dışındaki sülfidril içeriğinin % 90 kadarını oluşturan bir tripeptiddir. Glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden gamma glutamil sistein sentetaz ve glutatyon sentetaz enzimleriyle oluşur [97].

Serbest bir sülfidril grubuna sahip olan indirgenmiş GSH, hücre içi bir sülfidril tamponu olarak etkilidir ve hücreleri oksidatif ve toksik etkilere karşı korur. Eritrositlerde bulunan indirgenmiş GSH, hemoglobinin sistein gruplarını ve diğer hücre proteinlerinin tiol gruplarını indirgen şekilde tutar. Böylece hemoglobini oksidasyondan koruyarak hücrenin bütünlüğünü sağlar [97]. GSH, hidrojen peroksidi, lipid peroksidleri, disülfidleri, askorbatı ve serbest radikalleri indirgeyebilir. GSH'un peroksidlerle ve disülfidlerle reaksiyonu sonucu glutatyon disülfid oluşur. Glutatyon disülfid düzeyindeki artış oksidan stresin bir göstergesidir. Glutatyon disülfid, tiol içeren proteinlerin konformasyon ve aktivitesi üzerine zararlı etkileri olan bir maddedir [98,99].

1.13.Lipid Peroksidasyonu (LPO):

Oksidatif hasara en duyarlı biyomoleküllerden biri de membran lipidleridir. Lipid oksidasyonu sonucunda LPO oluşur. Lipid peroksidasyonu, membran yapısındaki poliansature yağ asitlerinin (PUFA), reaktif oksijen türleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehytler, hidroksi yağ asitleri, etan, pentan gibi sekonder ürünlere yıkılma reaksiyonudur [100]. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonu şeklinde ilerleyen, hedef sistemlerin yapı ve fonksiyonlarını bozan dejeneratif bir süreçtir [101].

Lipit peroksidasyonu ve peroksidasyon sonucu oluşan ürünler membran yapısına ve çeşitli hücre bileşenlerine zarar verir; membran geçirgenliği ve mikrovizkozitesi önemli şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehid (MDA), membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olarak, deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. MDA, proteinlere, fosfolipitlere ve nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir. MDA bakteri ve memeli hücrelerinde mutajenik ve sıçanlarda karsinojeniktir [71,72,102,103]. Lipid peroksidasyonunun diğer bir majör aldehyt ürünü olan 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) hücresel strese cevap olarak ve pek çok kronik ve inflamatuvar hastalıkta artar [104]. HNE daha zayıf mutajeniktir fakat lipit peroksidasyonunun major toksik ürünlerinden biridir [71].

Çeşitli çalışmalarda LPO artışına GSH-Px [105-108] ve diğer antioksidanlarda azalma eşlik etmiştir [109, 110]. Yapılan çalışmalarda HNE nin GSH ile kendiliğinden reaksiyona girdiği gösterilmiştir, ancak hücre içinde GSH-S transferazların reaksiyona katılmasıyla reaksiyon daha hızlı ilerler [111,112].

GSH-Px, HNE ile inkübe edildiğinde zaman ve konsantrasyona bağlı kompetitif inhibisyon nedeniyle enzimatik aktivite kaybolur [72]. HNE ile intrasellüler GSH konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda, başlangıçtaki azalmayı takiben bir artış olduğunu bildirmektedir [113, 114]. HNE bir yandan GSH'yi azaltırken diğer yandan sentezini de indüklemektedir [104]. Folat eksikliği durumunda beyin hücrelerinde glutatyon düzeylerinin arttığı bildirilmiştir [115]. LPO ürünlerinin GSH sentezini arttırmaları bu durumu açıklayabilir. LPO oksidatif stresin göstergelerinden biri olarak da değerlendirilebilir [71]. Bu amaçla LPO ürünlerinden olan MDA ve 4-hidroksinonealin ölçümü yapılmaktadır [72].

1.13.1.Lipid Peroksidasyonu, Prostoglandinlerin Nonenzimatik Etkileşimi:

Membran lipidlerinin peroksidasyonu, enzimlerin inaktivasyonuna ve membran proteinleri ile lipidler arasında bağ oluşumuna neden olarak hücre ölümünü hızlandırır. LPO, DM'un erken dönemlerinde başlar. Endonöral damarlara ve endotel hücrelerine toksik etkilerinden dolayı, sinir iletim hızında yavaşlamaya neden olurlar. Lipid peroksidler; vasküler endotele direkt zarar verebileceği gibi, prostoglandin biyosentezini de etkileyerek diyabetik nöropati patogenezinde rol oynar. Lipid hidroperoksitler endotelial prostasiklin sentezini azaltırlar [116].

1.14.Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP):

Astrositler beyinde nöronların yaşamlarını sürdürmesinde önemli bir rol oynarlar ve nöronların fizyolojik olarak fonksiyon görmeleri için gerekli olan iyonik çevrenin düzenlenmesini sağlarlar. Glial hücreler merkezi sinir sistemine karşı olan tahripleri takiben başlangıçtaki hücrel cevapları oluştururlar.

Reaktif gliosis fiziksel ve kimyasal tahriplerden kaynaklanan nöronal bozukluğa karşı astrositlerin bir reaksiyonudur. Bu olay astrositler için spesifik belirleyici olan GFAP'in aşırı bir ekspresyonu ile karakterize edilir. GFAP bir intrasellüler intermediate filamenttir. GFAP'nin stabil astrosidik süreçlerde esas olduğu ve hatta nöronal hasarlarda merkezi sinir sisteminin morfojenezi için kritik bir materyal olduğu bilinmektedir. Nöronal hasara cevap olarak astrositler GFAP yapımını hızlandırırlar [9,117].

İntermedier filaman proteinler beyin hücre iskeletini oluşturan ana unsurlardır [118]. Bir hücre iskelet protein ailesi üyesi olarak GFAP'nin astrositlerin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün sağlanmasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Sıçan çalışmalarında GFAP eksikliğinin sinaptik fonksiyonlarda değişikliğe yol açtığı tespit edilmiştir [119]. Santral sinir sisteminde, travma, genetik bozukluk, kimyasal hasar gibi durumlarda astrositler reaktif hale gelir, astrogliosis denilen tarzda cevap verirler. Astrogliosis GFAP senteziyle karakterizedir [43, 86,120].

Olgun olmayan astrositler esas olarak vimentin sentezlerler; bu hücreler matür hale geldiğinde vimentin yerine GFAP sentezine kayma olur; dolayısıyla GFAP sentezi beyin maturasyonunun bir göstergesi olarak da değerlendirilmektedir [121,122]. İnsanda GFAP gen mutasyonu erken yaşta ölümle sonuçlanan nörodejeneratif hastalıklara yol açmaktadır [123]. GFAP santral sinir sistemi hasarını gösteren bir test olarak kullanılabilmektedir [124].

Şimdiye kadar nar bitkisinin çiçeklerinin antioksidan etkisiyle ilgili çalışmalar çok az miktarda rapor edilmiştir. Son zamanlarda nar çiçeğinin yapılan litaretür taramalarında antioksidan etki gösterdiği saptanmıştır. Antioksidan etkisini sahip olduğu polifenolik bileşenleri sayesinde gösterdiği vurgulanmaktadır. Nar çiçeğinin postprandial hiperglisemi ve glukoz toleransını düzenlediği bulunmuştur.

Bu çalışma da oksidatif stresin diyabetteki rolü ve *Punica granatum* çiçeğinin antioksidan aktivitesi ile bu stresle başa çıkabilmedeki etkisi araştırılmaktadır.

Çalışmamız *Punica granatum* çiçeğinin antioksidan etki göstereceği dozlarda deneysel olarak STZ ile diyabet oluşturulmuş ratlara verilmesi ve diyabetin beyinde oluşturduğu oksidatif hasarı önlemesi ve antihiperglisemik etkisinin olduğunun saptanması üzerinedir. Rat beyinde özellikle hipokampusta diyabetin oluşturduğu semptomların hafızayı ve öğrenmeyi ne kadar etkilediği ve antioksidan etkisi olan *Punica granatum* çiçeğinin bu hasarı hangi dozlarda ne kadar önlediğinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2.MATERYAL VE METOD

2.1.Deney Hayvanları

Deneylerde kullanılan Wistar albino cinsi ratlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden temin edildi. Ratlar havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler, özel çelik kaplarda ve su da paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Deney hayvanları Elazığ Yem Fabrikasında özel olarak hazırlanan pelletler halindeki rat yemleriyle beslendi. Ratlara verilen yemin bileşiminde bulunan katkı maddeleri Tablo 4’de gösterilmiştir. Ratların deneysel uygulama yapılacak safhaya kadar bakımlarına bu şekilde devam edildi.

Tablo 4. Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi

Yem Bileşimi	
Su (en çok)	% 12
Ham protein (en az)	% 24
Ham selüloz (en çok)	% 7
Ham kül (en çok)	% 8
HCl’de çözünmeyen kül (en çok)	% 2
NaCl (en çok)	% 1
Mineral Karması *	% 1.25
Vitamin Karması **	%1.25
Metabolik enerji	2650 kcal/kg

* Mineral Karması: Kalsiyum (% 1.0-2.8), Fosfor (% 0.9), Sodyum (%0.5-0.7), Mangan (10 mg/kg), Çinko (4 mg/kg).

** Vitamin Karması: Vitamin A (300 IU/kg), Vit. D₃ (1000 IU/kg), Vit. E (60 mg/kg), Vit. B₂ (4 mg/kg).

2.2.Deneysel Uygulamalar

Deney hayvanlarının seçimi ve yapılan uygulamalar sırasında Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (FÜHADEK) (24.06.2008 / Toplantı: 6; Karar No:31) onayı alınarak; çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı.

Deneysel çalışmalara başlamadan önce, çıkabilecek aksaklıkların asgariye indirilmesi amacıyla ön çalışma yapıldı. Deney hayvanlarının bulundukları ortamın sıcaklığı 22-25 °C arasında sabit tutuldu ve hayvanlar 12 saat ışık altında ve 12 saatte karanlıkta takip edildi. Deneysel çalışmalarda ortalama ağırlıkları 220 gr (220 ±40 gr) olan toplam 60 adet Wistar-albino cinsi erkek ratlar kullanıldı. Ratlar ağırlıkları birbirlerine en yakın olanlar ayrı ayrı seçilerek her kafeste 4 rat olacak şekilde 3'er kafesli 5 grup oluşturuldu. Bu gruplar;

- 1.Grup: Kontrol grubu (n=12)
- 2.Grup: Diyabet (STZ) grubu (n=12)
- 3.Grup: STZ + Nar (*Punica granatum*) çiçeği I (n=12)
- 4.Grup: STZ + Nar (*Punica granatum*) çiçeği II (n=12)
- 5.Grup: STZ + Nar (*Punica granatum*) çiçeği III (n=12)

Mevcut laboratuvar şartlarımızda, deneysel diyabet oluşumunun kaçınıcı günlerde meydana geldiği gözlemlenerek deneysel uygulama başlatıldı. Çalışmanın başlangıcında ve her hafta düzenli bir şekilde ağırlık değişiklikleri kaydedildi.

1. Kontrol Grubu: 12 adet rattan oluşan bu gruba 8 haftalık uygulama boyunca hergün sadece rat yemi ve su ile beslendi. Gruptaki ratların bazal ve 7 hafta sonra örneklerin alınması öncesinde olmak üzere toplam 2 kez kan şekerlerine bakıldı.

2. STZ Grubu: 12 adet rattan oluşan bu gruba STZ, 60 mg/kg olacak şekilde 0.1 M fosfat-sitrat tamponunda (pH:4.5) çözündürülerek intraperitoneal enjeksiyonla tek doz olarak uygulandı. Bir hafta sonra kuyruk veninden alınan kanın glukometre cihazındaki ölçümü sonucu açlık kan glukozu 220 mg/dl'yi geçen ratlar, diyabetik olarak kabul edildiler. Ratlara 8 haftalık uygulama boyunca hergün sadece rat yemi+su verildi

3. STZ + Nar (*Punica granatum*) çiçeği I: İkinci grupta olduğu gibi diyabetik hale getirilen 12 adet rata 8 hafta boyunca her gün düzenli olarak oral yolla 300mg/kg/gün nar çiçeği ile beslenmesi sağlandı.

4. STZ+ Nar (*Punica granatum*) çiçeği II: Diyabetik hale getirilen 12 adet ratın 8 hafta boyunca her gün düzenli olarak 400mg/kg/gün nar çiçeği verildi.

5. STZ + Nar (*Punica granatum*) çiçeği III: Bu gruptaki diyabetik ratlara yine 8 hafta boyunca her gün düzenli olarak 500mg/kg/gün nar çiçeği verildi.

Kontrol grubunun kan glukoz seviyeleri 96 ± 5.8 mg/dL, diyabet grubunun 231 ± 3.2 mg/dL, diyabet + Nar çiçeği-I grubu 222 ± 3.4 mg/dL, diyabet + Nar çiçeği-II grubu 228 ± 3.8 mg/dL, diyabet + Nar çiçeği-III grubu 221 ± 4.4 mg/dL olarak ölçüldü.

2.3. Morris Water Maze Testi ve Probe test

Ratların öğrenme testleri olarak daha önceden Baydaş ve arkadaşlarının [125] tanımladığı şekilde Morris'in su tankı testi uygulandı. Deney hayvanları günde 4 kez olmak üzere 5 gün süreyle ard arda bu teste tabi tutuldular. Morris water maze (MWM) testi sıçan ve farelerde yaygın olarak kullanılan bir öğrenme ve bellek testidir. Laboratuvarımızda kullandığımız Morris'in su tankı, 120 cm çapında galvanizli, siyaha boyalı sirküler bir tank olup 50 cm yüksekliğindedir. Su tankı 30 cm kadar su ile dolduruldu ve suyun 1,5 cm altına bırakılan 10 cm çapındaki platformun görünmesi engellendi. Suyun ısı 25 ± 1 °C dereceye ayarlandı. Deney süresince tankın konumu ve platformun yeri sabit tutuldu. Deneklerin, bulunduğu yerin uzaysal konumunu algılayabilmeleri için floresan bir ampul tank dışına yerleştirildi (visual cues) ve deney süresince sabit tutuldu. Deney hayvanları bu görsel işaretlerin yardımıyla bulundukları yerin uzaysal konumunu algılayabilmektedirler.

Su tankı sanal olarak 4 kısma ayrıldı ve platform bu kuadranlardan birinin ortasına yerleştirildi. Sessiz ve sakin bir ortamda yapılan bu testte, sıçan bir araştırmacı tarafından nazikçe diğer 1/4 oranındaki alanlardan birinden suya bırakıldı ve yüzerek 60 sn. içinde platformu bulması beklendi. Platformu bulunca 30 sn. orada dinlenmesine izin verildi, sonra alınıp ayrı bir kafeste 30 sn. bekletildi.

Sıçanlar su tankına her defasında ayrı bir başlama noktasından bırakılarak aynı işlem her hayvan için 4 kez tekrarlanıp platformu bulma süreleri kaydedildi. Platformu 60 sn içinde bulamayan sıçan araştırmacı tarafından alınıp platformun üzerine bırakıldı ve 30 sn dinlenmesine izin verildi. Her hayvan için 5 gün süreyle aynı denemeler yapıp sıçanların platformu bulma süreleri kaydedildi. Tüm deneklerin yüzme performansları video kamera sistemi ile bilgisayara aktarıldı. Veriler bilgisayarlı video kayıt sistemi ile analiz edildi (Boğaziçi Biyomedikal, İstanbul, Türkiye).

Probe test: Belleğin pekiştirilme işlemi test etmek için, Morris water maze testinin 6. gününde her sıçana probe test uygulandı. Bu testte, platform tanktan alındı ve sıçanlar eğitim testindeki gibi suya bırakılarak 60 sn süresince yüzdürüldü. Sıçanların platformun önceden bulunduğu tankın dörtte birlik kısmında yüzdükleri süre ve bu kuadrana kaç kez girip çıktıkları kaydedildi. Sıçanların daha önceden platformun bulunduğu bu alanda daha çok arama yapması ve zaman geçirmesi beklenir. Hedef kuadradaki harcanan zaman hafızanın pekiştirilmesinin derecesini gösterir ve öğrenmeden sonraki yerini alır. Probe testini takiben, muhtemel sensory motor bozuklukları test etmek ve deneklerin görsel bozukluklarının olup olmadığını doğrulamak için visible test yapıldı. Platformun yeri değiştirilerek, tankın su seviyesi platformu görünür hale getirecek kadar azaltıldı. Her sıçanın bir denemede platformu bulma süresi kaydedildi.

2.4. Hipokampus Örneklerinin Alınması

Deneysel uygulamalar sonrasında etik kurulun aldığı kararlara uygun olarak dekapite edilen ratların total beyinleri alınarak, beyinin Hipokampus bölgesi ayrılarak kuru buzda hemen donduruldu. Örnekler darası alınmış olan eppendorf tüplere aktarıldı. Ağırlıkları hassas terazide tartılarak belirlendi ve analizler yapılınca kadar -70°C 'de saklandı.

2.5. Hipokampus Örneklerinin Hazırlanması

Hipokampus örneklerinin hazırlanmasında Baydaş ve arkadaşları tarafından uygulanan homojenizasyon yöntemi kullanıldı [126]. Taze veya dondurulmuş dokular 1:10 (w/v) oranında homojenizasyon solusyonunda [10mM Tris- HCl (pH=7.4), 0.1 mM NaCl, 0.1mM fenil metil sülfonil florid (PMSF), 5µM soybean (bir tripsin inhibitörü olarak)] cam bir homojenizatör yardımıyla soğuk ortamda homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4 °C’de 60 dakika süreyle 60.000 x g’de santrifüj edildi. İlk süpernatantlar eppendorf tüplere alınarak LPO ve GSH analizleri yapılmaya kadar –70 °C’de saklandı. Pelletler eşit hacimde ilave edilen homojenizasyon solusyonunda [25 mM Tris-HCl (pH= 7,4), 0.1mM PMSF, % 2’lik TritonX –100 ve % 1’lik SDS] yeniden süspanse edildi. +4 °C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı ve homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4 °C’de 60 dakika süreyle 60.000 x g’de santrifüj edildi. Elde edilen 2. süpernatantlar eppendorf tüplere alınarak SDS-PAGE ve Western blot analizleri için –70 °C’de saklandı.

2.6. Hipokampus Örneklerinde Lipit Peroksidasyonu (LPO) Ölçüm Yöntemi

Doku lipit peroksidasyonu; malondialdehit (MDA) + 4-hidroksialkenal (4-HDA) seviyeleri, LPO-586 (Oxis International, Inc., Portland, USA) ticari kiti kullanılarak tespit edildi.

Kullanılan maddeler:

Ayıraç I (R1); Asetonitrilde hazırlanmış 10.3 mM N-metil-2-fenil indol

Ayıraç II (R2); 15.4 metansülfonik asit

4-HNE standart solusyonu (S1); Asetonitrilde hazırlanmış 10 mM 4-hidroksinonenal

MDA standart solusyonu (S2); 20 mM Tris-HCl (pH: 7.4) solusyonu ile hazırlanmış 10 mM 1,1,3,3-tetrametoksipropen

Yöntem:

Standart solusyonlarının hazırlanması:

Standart konsantrasyonu (μM):	0	2,5	5	10	15	20
	(Kör)					
Standart 100 μM (μl):	0	25	50	100	150	200
Distile su (μl):	200	175	150	100	50	0

Kör, standart ve örnekler için polipropilen mikrosantrifüj tüpleri hazırlandı.

Standartlar için hazırlanmış tüplere değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış standart solusyonlarından 200 μl ilave edildi.

Kör için hazırlanmış tüpe 200 μl su ilave edildi.

Örnekler için hazırlanmış tüplerin herbirine 200 μl örnek ilave edildi.

Kör, standart ve örnek tüplerinin herbirine asetronitrilde hazırlanmış 0.5 M Bütilat hidroksitoluen (BHT) solusyonundan 10 μl ilave edildi.

Kör, standart ve örnek tüplerinin herbirine 650 μl R1 ayıracından eklendi ve vorteksle iyice karıştırıldı.

Kör, standart ve örnek tüplerinin herbirine 150 μl R2 ayıracından eklendi ve tüplerin ağzı kapatılarak vorteksle iyice karıştırıldı.

45 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 45 dakika inkübasyon yapıldı.

Tüpler mikrosantrifüjde 15000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar dikkatlice ayrıldı.

Süpernatantlar küvetlere aktarıldı ve absorbansları 586 nm'de spektrofotometrede okundu.

Örneklerin okunan absorbans değerleri kitte verilen formül kullanılarak ve dilüsyon oranları göz önünde bulundurularak hesaplandı.

2.7. Hipokampus Örneklerinde Glutasyon (GSH) Ölçüm Yöntemi

Örneklerdeki Glutasyon (GSH) seviyeleri, GSH-400 (Oxis International, Inc., Portland, USA) ticari kiti kullanılarak tespit edildi.

Kullanılan maddeler:

Ayıraç I (R1); 0.2 N HCl de hazırlanmış 1.2×10^{-2} Mikromojenik ayıraç solusyonu

Ayıraç II (R2); % 30 NaOH

Tampon solusyonu (S3); 0.2 mM dietilen triamin penta asetik asit (DTPA) ve % 25 (w/v) lubrol içeren 20 mM potasyum fosfat (pH: 7.8) solusyonu

Yöntem:

Standart solusyonlarının hazırlanması:

Standart konsantrasyonu ($\mu\text{mol/L}$):	0	20	40	60	80	100
(Kör)						
Tampon S3 (μl):	900	860	820	780	740	700
GSH çalışma solusyonu (0.5 mmol) (μl):	0	40	80	120	160	200

Kör, standart ve örnekler için polipropilen mikrosantrifüj tüpleri hazırlandı.

Standartlar için hazırlanmış tüplere değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış standart solusyonlarından 100 μl alındı ve 900 μl tampon solusyonu ilave edildi.

Kör için hazırlanmış tüpe 100 μl kör solusyonu alındı ve 900 μl tampon solusyonu ilave edildi.

Örnekler için hazırlanmış tüplerin herbirine 100 μl örnek alındı ve 900 μl tampon solusyonu ilave edildi.

Kör, standart ve örnek tüplerinin herbirine 50 μl R1 ayıracından eklendi ve vorteksle iyice karıştırıldı.

Kör, standart ve örnek tüplerinin herbirine 50 μl R2 ayıracından ilave edilerek karanlık ortamda 25 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

Örnekler küvetlere aktarıldı ve absorbansları 400 nm'de spektrofotometrede okundu.

Örneklerin okunan absorbans değerleri kitte verilen formül kullanılarak ve dilüsyon oranları göz önünde bulundurularak hesaplandı.

2.8. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE jel sisteminde akrilamid monomerlerinden yararlanılır. Amonyum persülfat (APS) gibi bir serbest radikal ile TEMED gibi stabilizatörü sağlayıcı ortamda akrilamid monomerleri uzun zincirler oluşturacak şekilde polimerleşmekte ve daha sonra oluşan bu uzun zincirler arasında yanıl bağlantılar oluşarak jel meydana gelmektedir. SDS-PAGE analizinde jelin yapısında yer alan sodyum dodesilsülfat (SDS) deterjanın bulunması ile proteinler kendilerini oluşturan monomer alt birimlerine ayrılmaktadır. Böylece protein agregasyonu önlenmektedir. SDS moleküllerine bağlanan denatüre polipeptidler negatif yük kazanırlar. SDS bağlantılı polipeptid kompleksleri, molekül ağırlıklarına bağlı olarak jel içerisinde hareket ederler. Hareket eden moleküllerin ağırlıkları; aynı jel üzerinde bulunan bir standartla karşılaştırılarak tespit edilir. Mutasyon geçirmiş veya çeşitli olumsuz evre faktörleri sonucunda canlı organizmanın bir kısım proteinlerinden normale göre parça kopması veya parça ilavesi ya da bazı proteinlerin yeterince sentezlenmemesi gibi özellikler bu jel sisteminde tespit edilmeye çalışılır.

Protein moleküllerinin hareketi güç kaynağından gelen elektrik akımına göre negatif (-) kutuptan pozitif (+) kutuba doğru olur. İncelenecek protein molekülleri şayet 0-43 kDa aralığına tekabül ediyorsa akrilamidin konsantrasyonu %15, 40 kDa'dan yukarı ise akrilamidin konsantrasyonu %10 veya daha aşağı düşürölür. Diğer bir ifade ile molekülün ağırlığı arttıkça akrilamidin konsantrasyonu düşürölür. Akrilamid konsantrasyonunun artışı jel içerisindeki ara boşlukların daha sık olmasına sebep olmaktadır. Dolayısıyla protein moleküllerinin hareket hızı da azalmaktadır [127].

Kullanılan çözeltiler

1.5 M Tris-HCl (pH 8.8.)

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8.)

% 10 Sodyum dodesilsülfat çözeltisi (SDS)

%30 Akrlamid/Bisakrlamid çözeltisi

%10 Amonyum persülfat çözeltisi (APS)

N, N, N', N', -tetrametil-etilendiamin (TEMED)

Gliserin

2-β-merkaptoethanol

%0,05 Bromofenol blue çözeltisi

Boyama çözeltisi (Stain solusyon/100 ml):

%0.1 Coomassie blue R-250

%45 Metanol

%10 Glasiyal asetik asit

%45 Distile su

Boya çıkarma çözeltisi (Destain solusyon/100ml):

%45 Metanol

%10 Glasiyal asetik asit

%45 Distile su

Tank solusyonu (Running buffer, pH 8.3):

Tris base 9.0 gr.

Glisin 43.0 gr.

Distile su 600 ml.

2.8.1 SDS-PAGE için jellerin hazırlanması

SDS-PAGE de kullanılan Separating (ayırma)jeli (%12) ve Stacking (yükleme) jeli (%4) ayrı ayrı hazırlandı (tablo 5, 6). Örnek solüsyonların hazırlanması tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 5. Separating jelinin hazırlanması

Separating (ayırma) jelinin hazırlanması (%12)	Miktar
Distile su	3,35 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml
% 10 SDS	100 µl
Akrilamid /Bis (%30)	4.0 ml
Amonyum persülfat (%10)	50 µl
TEMED	5 µl
Toplam	10.0 ml.

Tablo 6. Stacking jelin hazırlanması

Stacking (yükleme) jelin hazırlanması (%4)	Miktar
Distile su	6.1 ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 ml.
SDS (%10)	100 µl
Akrilamid-Bis (%30)	1.3 ml
Amonyum persülfat (%10)	50 µl
TEMED	10 µl
Toplam	10.0 ml

Tablo 7. Örnek solusyonların hazırlanması

Örnek solusyonları (Sample Buffer) hazırlanması	Miktar	Son konsantrasyon
1 M Tris-HCl (pH6.8)	1.25 ml	0.125 M
% 10 SDS	1.6 ml	%4
%0.05 bromofenol blue	0.2 ml	%0.002
Gliserol	0.8 ml	% 20
2- β -merkaptoethanol	0.4 ml	%10
Distile su	3.75 ml	-
Toplam	8.0 ml	-

2.9. Hipokampus Örneklerinin SDS-PAGE ile Analizi

Serbest ve serbest olmayan protein örnekleri Laemmli tarafından belirtildiği şekilde hazırlanan SDS-PAGE ile incelendi [127].

Jel oluşturmak için uygun bir pozisyonda tutturulan iki cam arasına yerleştirilmek üzere 10 ml' lik separating jel solusyonu hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla belirli kısımlardan sıkıştırılarak kaset haline getirilen iki cam levha arasına aktarıldı. İki cam levha arasına jel ilave edilirken üst kısımda tarak dişlerinin yüksekliği kadar (≈ 1 cm) bir boşluk bırakıldı. Hazırlanan kaset şeklindeki bu iki cam levha arasındaki jel yaklaşık olarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek aralarındaki akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlandı. Daha sonra iki cam levhanın üst kısmına örnek sayısına uygun sayıda dişe sahip tarak yerleştirildi.

Tarak dişlerinin ara dolgu maddesi olarak ifade edilen stacking jel 10 ml kadar hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla, jel kasetine yerleştirilmiş olan tarak dişleri arasındaki boşluklar dolduruldu. Bu dolgu iki camın en üst seviyesine kadar tamamlandı. Stacking jel çok çabuk polimerize olduğundan işlemlerin kısa sürede yapılmasına dikkat edildi. 25-30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polimerleşme sağlandı. Tarak, polimerleşmesi tamamlanan jelden çıkarıldı.

Bu işlem sırasında jel de meydana gelen ve örneklerin bırakılacağı yuvaların bozulmamasına dikkat edildi. Cam levhalardan oluşan kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Protein çözücü solusyonu; 0,125 M Tris (pH 6.8), %2'lik SDS, %0.002 oranında Bromofenol mavisi, %20'lik gliserol, %10'luk merkaptoethanol şeklinde hazırlandı. Yaklaşık olarak 150 µl olarak alınan her bir protein örneğine eşit oranda çözücü solusyondan ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Tarak dişinin genişliğine bağlı olarak, hazırladığımız karışımdan 10-20 µl kadar transfer edildi. Tank içerisine yeterli miktarda tank solusyonu ilave edildi.

Güç kaynağından önce düşük bir voltajla (150 V) akım elektroforeze verildi. 5-10 dakika sonra voltaj değeri yükseltildi (180-200 V). Çıplak gözle izlenilebilen mavi boya bandı jelin alt kısmına gelince elektroforez cihazı kapatıldı. Örnekler cam kasetin altına geçtikten sonra GFAP için 25 dakika bekletildi.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra kaseti oluşturan iki cam birbirinden ayrılarak aradaki jel çıkarıldı. Protein bantlarının görünür hale gelebilmesi için bu jel % 1.25'lik Coomassie blue boya ortamına alındı. Burada en az yarım saat en çok bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi.

Boya solusyonundan alınan jel boyayı giderici solusyon (destain solusyon) ortamına alındı. Arasıra çalkalanarak protein bantlarının dışındaki boya maddesi uzaklaştırıldı. Boya giderici solusyonda 5'er dakika bekletildi ve solusyon döküldü. Jel tekrar boya giderici ortama alındı ve bu işlem 2-3 kez tekrarlandı. Böylece jel üzerinde bulunan protein bantlarının dışındaki boya giderilmiş oldu. Jel üzerinde görünür hale gelen protein bantlarının fotoğrafları bir kamera yardımıyla çekildi.

2.10. Western Blot

Western blot; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, nitroselüloz membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla gösterilmesidir. Blotlama yapılmadan önce çalışılan örneklerdeki proteinler elektriksel ortamda poliakrilamid jel üzerinde göç ettirilmektedir. Proteinlerin elektroforezleri SDS-PAGE'de gerçekleştirilmektedir [128].

Western blot tekniği, elektroforez işlemini takip eden 4 aşamada gerçekleştirilir. Bunlar; jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son aşamada ise proteinlerin görüntülenme aşamalarıdır [129, 128].

Nitroselüloz membrana transfer sırasında jel ile nitroselüloz membran karşı karşıya getirilmekte ve bunlar filtre kağıtları arasına yerleştirilmektedir. Jelin büyüklüğü ile orantılı olarak belirli bir süre elektrik akımı uygulanıp proteinlerin transferi sağlanmaktadır. Nitroselüloz membranın özgül olmayan proteinlerle bloklanmasında albumin tercih edilmektedir [129].

Spesifik antikorlar olarak monoklonal ya da poliklonal antikorlar kullanılabilir. Monoklonal antikorların kullanımı, yalnızca tek bir epitopa özgül olmaları ve çok güçlü immünokimyasal köprüler oluşturmalarından dolayı avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle, monoklonal antikorlar antijene spesifik bir bağlanma gösterir. Ancak, çalışılan proteinler arasında benzer epitop bölgeleri bulunmakta ise çapraz reaksiyonlar sonucunda yalancı pozitiflikler ortaya çıkabilmektedir. Poliklonal antikorların kullanılması durumunda aynı nedenden dolayı şekillenen yalancı pozitiflik ihtimalinin daha fazla olduğu bilinmektedir [131].

Western blotta monoklonal antikorların kullanımının en önemli dezavantajı, SDS-PAGE ve blotlama esnasında polipeptid yapılarıdaki epitopların ortadan kaldırılmasıdır. Belirlenmeye çalışılan epitopun ortadan kaldırılması durumunda ise monoklonal antikor-epitop bağlanması şekillenemez. Bu nedenden dolayı monoklonal antikor kullanıldığında, poliklonal antikorla çalışılmasına kıyasla, yalancı negatiflik ihtimali artmaktadır [129].

Özgül antikordlarda raportör madde olarak genellikle radyoaktif izotoplar veya enzimler kullanılmaktadır. Enzim olarak alkalen fosfataz ve peroksidaz enzimleri tercih edilmektedir. Bu enzimlerin substratları ve kromojen maddeleri birbirinden farklıdır. Son yıllarda enzimle işaretlemede, testin duyarlılığını arttırmak amacıyla peroksidazla işaretleli avidin biyotin sisteminin kullanımı yaygınlaşmıştır. Kullanılan kromojenlerin en önemli özelliği çözünmeyen renkli ürünler oluşturmalarıdır [130].

2.11. Hipokampus Örneklerinin Western Blot ile Analizi

Hipokampus örneklerinin western blot analizi Baydaş ve arkadaşları tarafından uygulanan metoda göre yapıldı [126]. Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama): SDS-PAGE tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere alındı. Nitroselüloz membrana transferin gerçekleştirilmesi için poliakrilamid jel ile nitroselüloz membran (Schleicher and Schuell, Inc., USA) yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak biçimde karşı karşıya getirildi ve bunlar filtre kağıtlarıyla sarılmış bir şekilde blotlama düzeneğine yerleştirilerek tampon solusyonuyla doyuruldu. Soğutulmuş tampon solusyonuyla doldurulmuş tanka yerleştirilen düzenek için 60 dakika boyunca 150 mA elektrik akımı uygulandı. Bu şekilde proteinlerin transferi sağlanmış oldu.

Spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama): Blotlama işlemi bittikten sonra petri kutularına alınan nitroselüloz membranlar tampon solusyonla [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.025 M), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.075 M), NaCl (1.45 M)] çalkalayıcı üzerinde 3 kez 5 dakika olacak şekilde yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalar, 100 mM NaCl, 20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 (pH: 7.2) tamponunda % 1'lik taze sığır serum albumini ile 37 °C'de 90 dakikalık inkübasyonla blokladı.

Özgül antikorlarla tepkime: Primer antikor olarak poliklonal rabbit anti-rat GFAP kullanıldı. GFAP primer antikoru % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:2000 oranında hazırlanarak kullanıldı. Nitroselüloz membranlar GFAP antikoru ile +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki safhada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solusyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immünoglobulinle 37 °C'de 90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solusyonuyla yıkandı.

Bantların görüntülenmesi: Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda % 0.03-0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin (DAB) solusyonu kullanıldı. DAB'la reaksiyon sonucu nitroselüloz membranlar üzerindeki bantlar kısa bir süre sonra görünür hale geldi. 5-10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda DAB'la renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra nitroselüloz membranlar iyice yıkandı. Nitroselüloz membranlar iyice kurutulduktan sonra, bantların rölatif yoğunlukları analiz edilmek üzere alındı. Bantların rölatif yoğunlukları Lab. Works 4.0 (Ultra Violet Products Ltd. Combridy, CD4 1TG UK) software programı kullanılarak analiz edildi.

2.12. İstatistiksel Metod

Elde edilen veriler SPSS-16 bilgisayar paket programına yüklendi. İstatistiksel analizlerde; GFAP, LPO, GSH düzeylerinin gruplar arası anlamlığı One Way ANOVA testi, Morris Water Maze öğrenme testinin değerlendirilmesinde tekrarlayan ölçümlerde Varyans analizi kullanıldı. $P < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

Deneysel çalışmaların sonucunda diyabet grubunda 4 rat, diyabet + Nar çiçeği-I grubu 2, diyabet + Nar çiçeği-II grubu 3, diyabet + Nar çiçeği-III grubunun 4'ü öldü. Deney aşamasının sonunda Morris Water Maze Testi için çalışmaya her gruptan 8 hayvan alındı.

Kontrol, Diyabet, diyabet + Nar çiçeği-I grubu, diyabet + Nar çiçeği-II grubu ve diyabet + Nar çiçeği-III grubundan 8'er hayvan dekapite edilerek GFAP, LPO ve GSH çalışıldı.

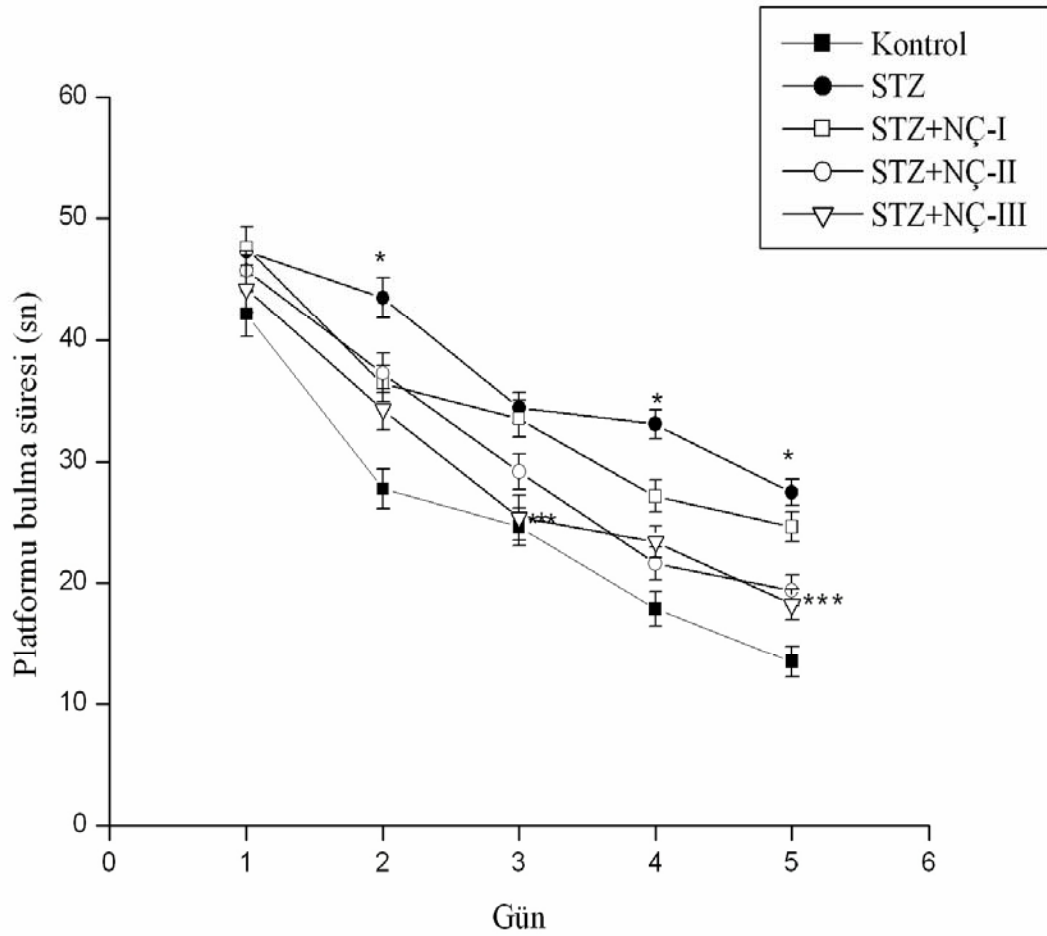
Tablo 8. Deney Hayvanlarının Ortalama Vucüt Ağırlıkları

Vücut Ağırlığı (gr)	Kontrol	STZ	STZ+NÇI	STZ+NÇII	STZ+NÇIII
Deney Öncesi	232±36	211±17	216±22	220±26	228±30
Deney Sonrası	276±42	154±18	176±20	182±24	196±26

3.1. Morris Water Maze Öğrenme Testinin Sonuçları:

Kontrol, Diyabet, diyabet + Nar çiçeği-I grubu, diyabet + Nar çiçeği-II grubu ve diyabet + Nar çiçeği-III gruplarının öğrenme yeteneklerinin 1.günden 5.güne doğru gittikçe arttığı gözlemlendi. Veri analizleri hesaplanması 5 grup birden toplu hesaplandı. Diyabetik ratların (STZ grubu) platformu bulma süreleri kontrole göre 3. ,4. ve 5. günlerde istatistiksel olarak anlamlı olup daha uzundu (sürenin uzun olması öğrenmenin daha kötü olduğu anlamına gelmektedir, * $p<0.001$). STZ+NÇ-I grubunun STZ grubuna göre daha iyi davranış gösterdiği saptandı. Diğer gruplara göre kontrol grubuna en yakın hafıza ve öğrenme testi başarısı gösteren grup STZ+NÇ-III grubuydu ve STZ, STZ+NÇ-I. gruplarına göre anlamlıydı (** $p<0.05$). STZ+NÇ-II grubu ise diyabet ve STZ+NÇ-I grubundan platformu bulma süresi bakımından daha iyidi.

Diyabet (STZ) gruplarına nar çiçeği uygulamasının, STZ grubundaki davranış performansındaki kötüleşmeyi 4. ve 5. günlerde düzelttiği görüldü. STZ+NÇ-III grubu performansı 3. ve 5. günde kontrol grubuna çok yakındı. Şekil 3.'de deney gruplarının günlere göre ortalama platformu bulma zamanları görülmektedir.

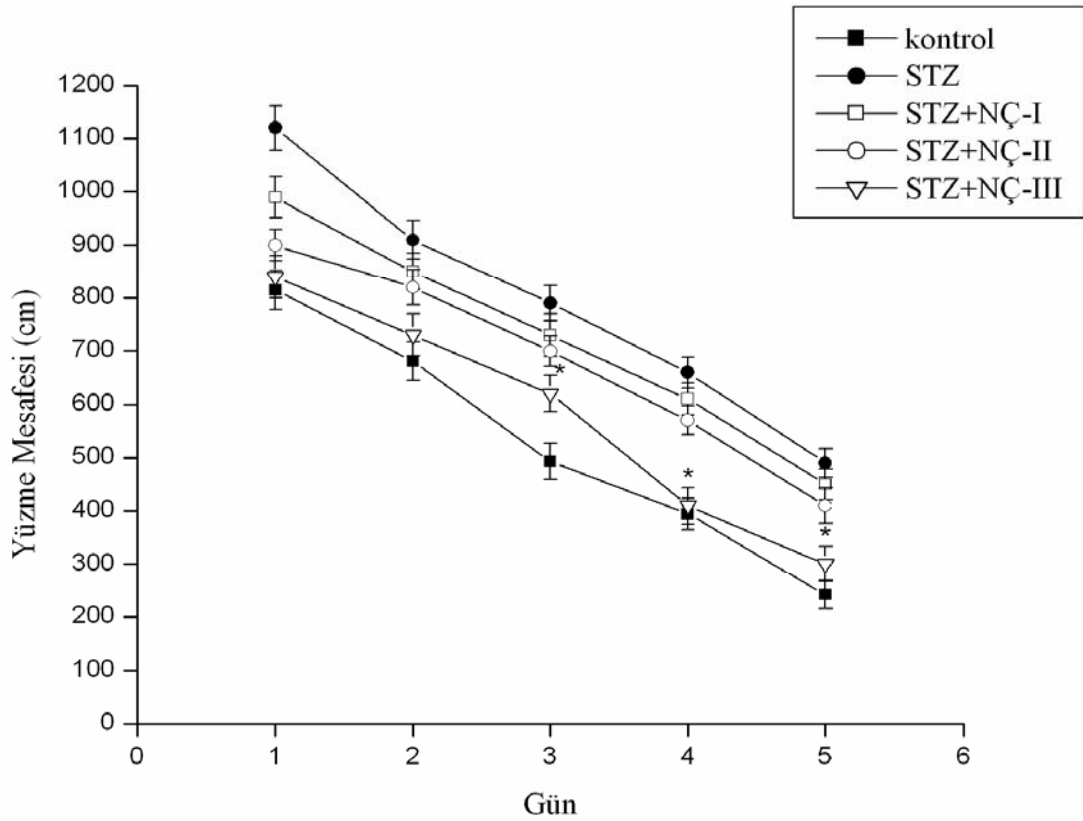


Şekil 3. Grupların günlerdeki ortalama platformu bulma süreleri.

(*** $p < 0.05$) ve (* $p < 0.001$) anlamlı farklılık vardı. Kont: Kontrol; STZ: Streptozotosin; STZ+NÇ-I: Streptozotosin+Nar Çiçeği-I, STZ+NÇ-II: Streptozotosin+Nar Çiçeği-II, STZ+NÇ-III: Streptozotosin+Nar Çiçeği-III

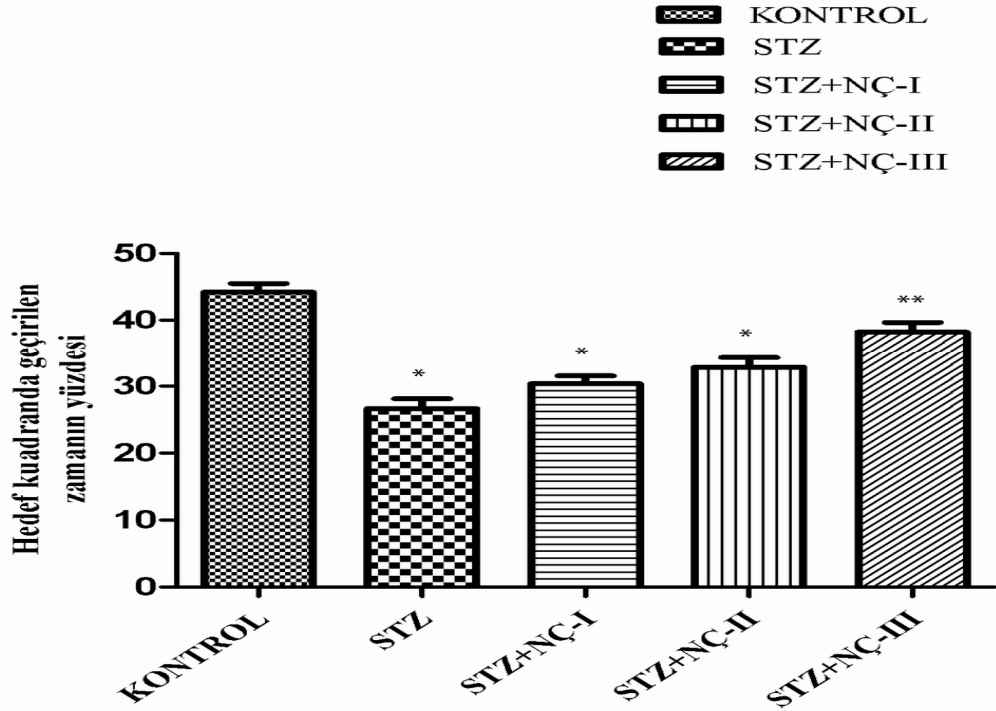
STZ, STZ+NÇ-I grubu, STZ+NÇ-II grubu ve STZ+NÇ-III ve kontrol gruplarının platformu bulmak için katettikleri ortalama yüzme mesafeleri 1. günden 5. güne doğru giderek azaldığı gözlemlendi. STZ grubu platformu bulmak için kontrole göre daha uzun mesafe yüzdü. Nar çiçeği uygulanan STZ grubundaki ratlarda kontrole en yakın yüzme mesafesi olan grup STZ+NÇ-III grubuydu. Ve STZ, STZ+NÇ-I, STZ+NÇ-II gruplarına göre anlamlıydı (* $p<0.05$). Yine STZ grubuna göre platformu bulmak için ortalama yüzme mesafesi az olan gruplar sırasıyla STZ+NÇ-II ve STZ+NÇ-I grubudur.

Şekil 4.'de gruplarının günlere göre platformu bulmak için katettikleri mesafe görülmektedir. STZ grubuyla STZ+NÇ-I grubu ve STZ+NÇ-II grubu arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (Şekil 4).



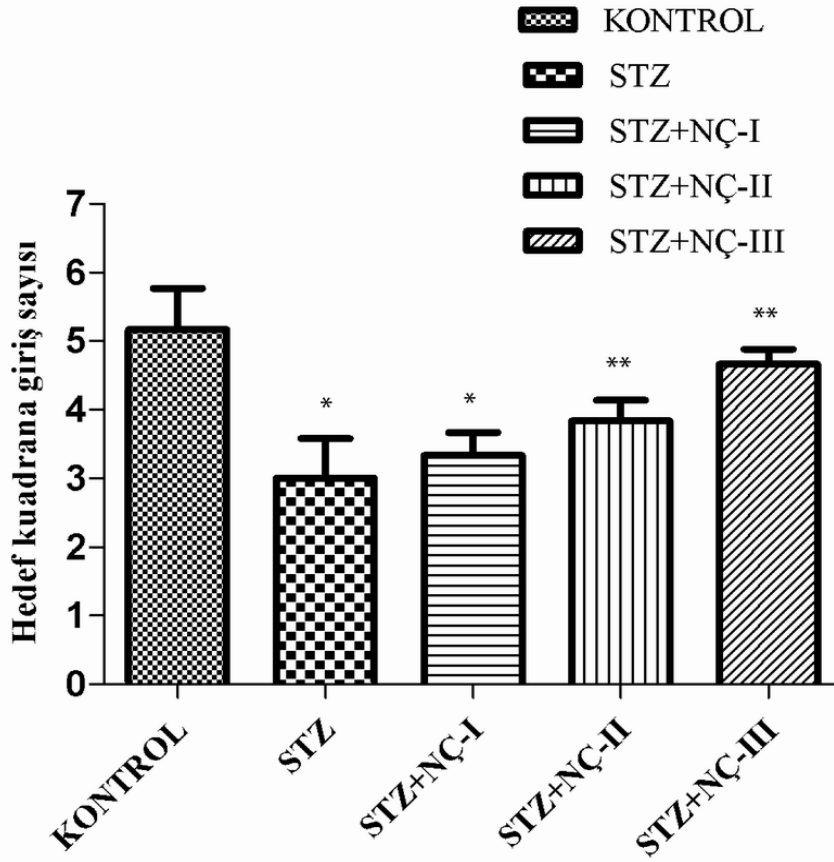
Şekil 4. Grupların günlerdeki platformu bulmak için katedilen yüzme mesafesi. STZ+NÇ-III grubu 3.,4., ve 5. günlerde STZ grubuna göre anlamlı bir farklılık vardı (* $p<0.05$) Kont: Kontrol; STZ: Streptozotosin; STZ+NÇ-I: Streptozotosin+Nar Çiçeği-I, STZ+NÇ-II: Streptozotosin+Nar Çiçeği-II, STZ+NÇ-III: Streptozotosin+Nar Çiçeği-III,

Probe test, belleğin pekiştirilmesini test eden bir deneydir. Daha önce platformun bulunduğu kuadranda deneğin geçirdiği süre yüzde oran olarak ölçülmektedir. Diyabetik ratlar (STZ grubu) sırasıyla kontrol, STZ+NÇ-I, STZ+NÇ-II ve STZ+NÇ-III grubuna göre probe test sırasında kaldırılan platformun daha önce lokalize olduğu kuadranda daha az sürede bulundular. Kontrol grubuyla, STZ+NÇ-III grubu arasında ve STZ, STZ+NÇ-I, STZ+NÇ-II grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$). STZ grubuyla, kontrol grubu arasında anlamlı bir fark vardı (* $p<0.05$). STZ+NÇ-III grubu STZ, STZ+NÇ-I, STZ+NÇ-II grupları göre anlamlı bir olarak fark olduğu (** $p<0.05$) kontrol grubuna en yakın sonucu verdiği tespit edildi. Bu sonuçlar gruplarda yüzme yeteneği ve motivasyonlarının bazı farklılıkların olduğunu, uzaysal performansta gözlenen farkın sensorimotor bozukluklara bağlı diyabetin etkisi ile antioksidan polifenolik bileşik içeren nar çiçeğinin bu etkiyi inaktif hale getirme çabasını göstermektedir (Şekil 5).



Şekil 5. Probe testi: Grupların başlangıçta platformun lokalize olduğu hedef kuadranda geçirdikleri zamanın yüzdesi. (*, ** $p<0.05$). Kont: Kontrol; STZ: Streptozotosin; STZ+NÇ-I: Streptozotosin+Nar Çiçeği-I, STZ+NÇ-II: Streptozotosin+Nar Çiçeği-II, STZ+NÇ-III: Streptozotosin+Nar Çiçeği-III.

Deney gruplarının başlangıçta platformun lokalize olduğu kuadrana giriş sayıları da değerlendirildi. Kontrol grubuyla STZ grubu arasında hedef kuadrana giriş sayılarında oldukça fark vardır ve hedef kuadrana giriş sayısı diyabetik ratlarda anlamlı olarak daha azdı (* $p<0.05$). Kontrol grubuna en yakın değer STZ+NÇ-III grubuna aittir. STZ+NÇ-III grubuyla STZ ve STZ+NÇ-I grupları arasındaki fark anlamlıydı (** $p<0.05$), (şekil 6).



Şekil 6. Her beş grubun hedef kuadrana giriş sayıları (*,** $p<0.05$) .

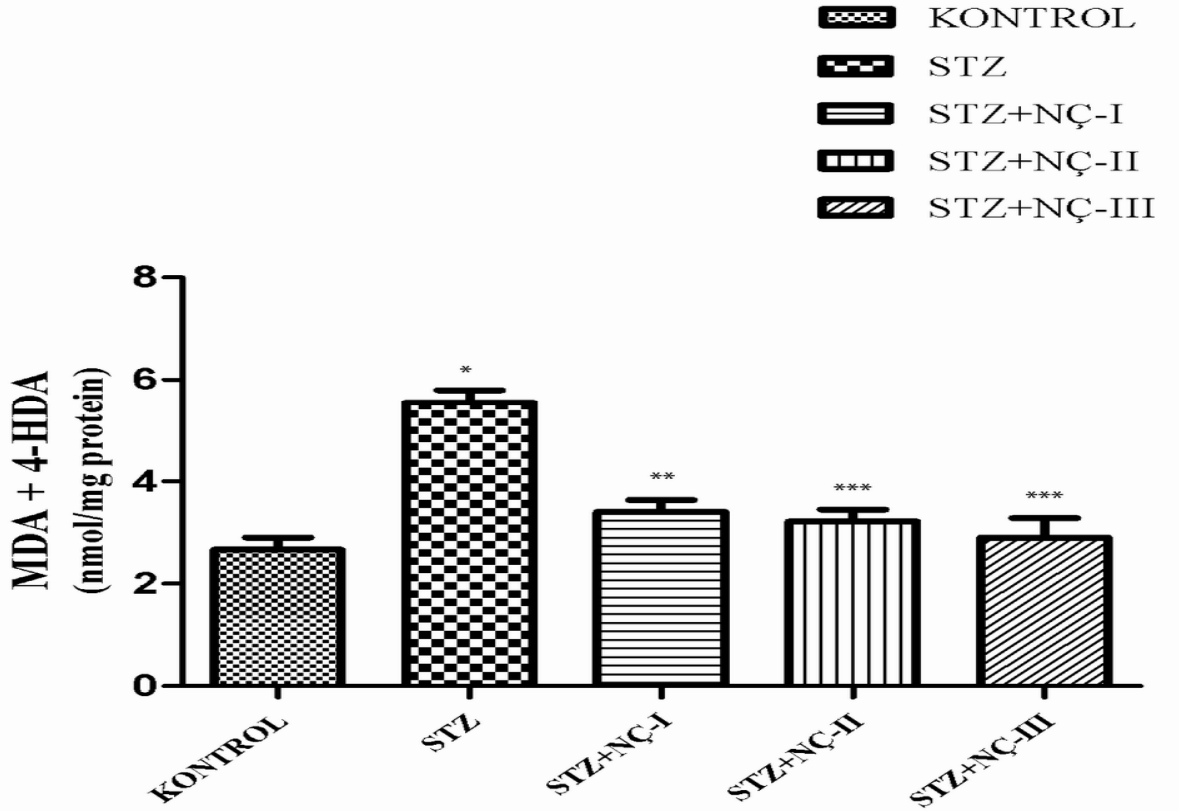
Kont: Kontrol; STZ: Streptozotosin; STZ+NÇ-I: Streptozotosin+Nar Çiçeği-I, STZ+NÇ-II: Streptozotosin+Nar Çiçeği-II, STZ+NÇ-III: Streptozotosin + Nar Çiçeği-III

Visuel test görsel, fiziksel veya sensorimotor defektlerin olup olmadığını test eden bir deneydir. Platformu görünür hale getirdikten sonra yapılan visuel testte, her beş grubun platformu bulma süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. (Kontrol grubu 13.5 ± 0.9 sn STZ 15.1 ± 1.0 grubu STZ+NÇ-I 14.8 ± 0.8 STZ+NÇ-II 14.2 ± 0.9

STZ+NÇ-III 13.9 ± 0.7). Bu sonuçlar gruplarda yüzme yeteneği ve motivasyonlarının benzer olduğunu, uzaysal performansta gözlenen farkın sensorimotor bozukluklara bağlı olmadığını gösteriyor.

3.2. Hipokampusta Lipid Peroksidasyonu (LPO) Düzeyleri:

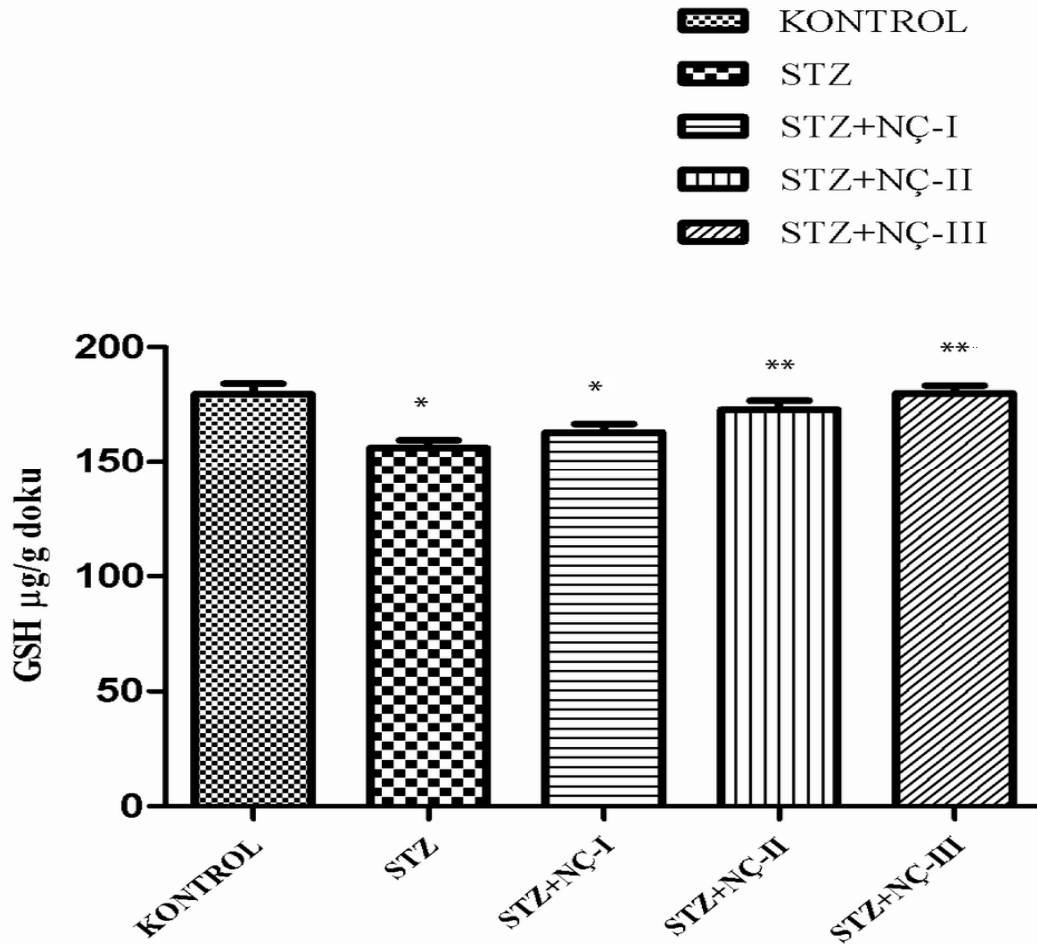
Deney gruplarında hipokampusta LPO (MDA+4-HDA) düzeyleri ölçüldü. STZ grubundaki MDA miktarı kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek tespit edildi (* $p < 0.05$). STZ grubuna göre STZ+NÇ-I (** $p < 0.05$) ve STZ+NÇ-II, STZ+NÇ-III (** $p < 0.05$), gruplarındaki LPO değerleri anlamlı olarak daha düşük bulundu. Bu da nar çiçeği uygulamasının STZ grubundaki artmış lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermektedir (Şekil 7).



Şekil 7. Gruplarda beynin hipokampus bölgesindeki LPO (MDA+4-HDA) düzeyleri. (*, **, *** $p < 0.05$). Kont: Kontrol; STZ: Streptozotosin; STZ+NÇ-I: Streptozotosin + Nar Çiçeği-I, STZ+NÇ-II: Streptozotosin+Nar Çiçeği-II, STZ+NÇ-III: Streptozotosin + Nar Çiçeği-III

3.3. Hipokampusta Glutasyon (GSH) Düzeyleri:

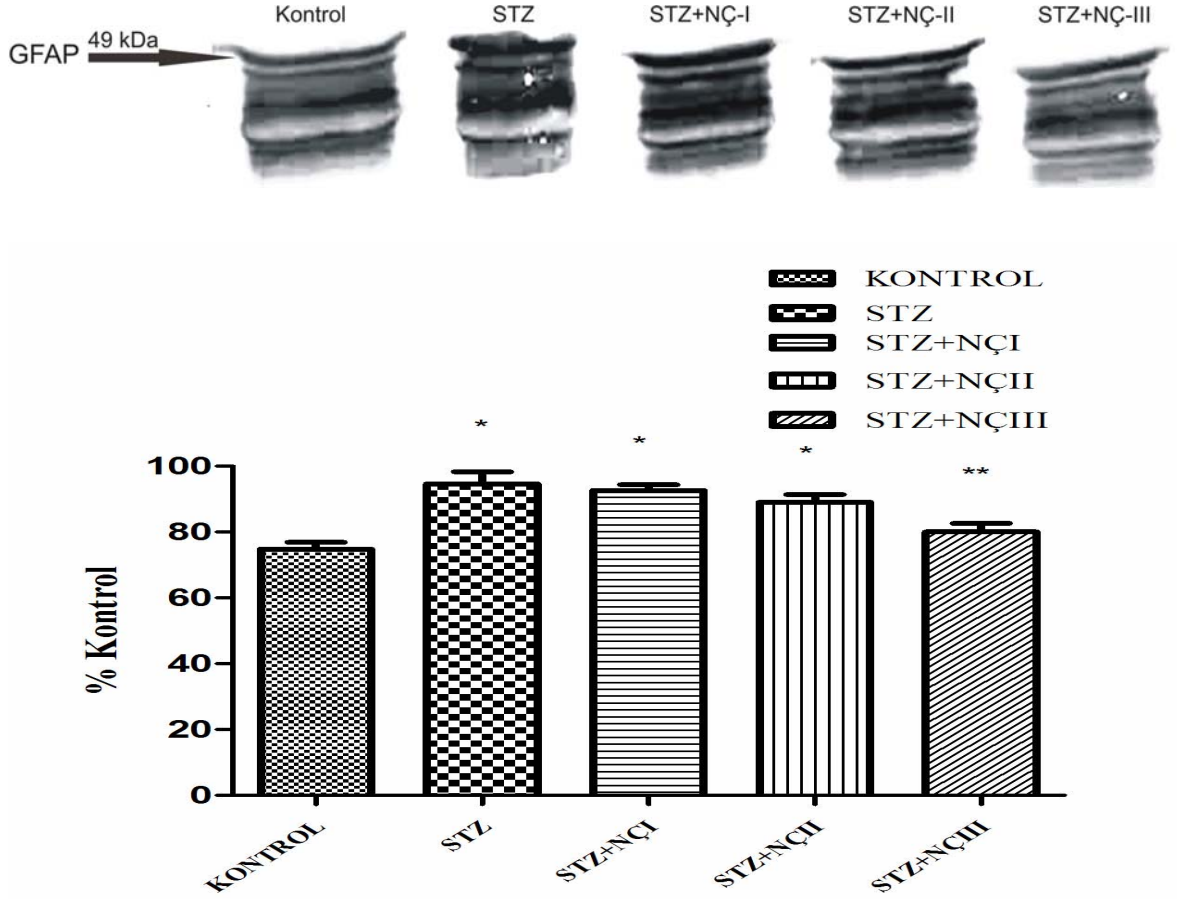
Deney gruplarında beynin hipokampus bölgesindeki GSH (glutasyon) düzeyleri ölçüldü. STZ grubuna göre STZ+NÇ-I, STZ+NÇ-II ve STZ+NÇ-III gruplarındaki GSH değerleri anlamlı olarak daha yüksek bulundu (** $p<0.05$). STZ grubu kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük tespit edildi (* $p<0.05$). Kontrol grubuyla STZ+NÇ-II ve STZ+NÇ-III grupları arasında anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir (** $p>0.05$). Bu da nar çiçeği uygulamasının STZ grubundaki glutasyon miktarını artırdığını göstermektedir (Şekil 8).



Şekil 8. Gruplarda beynin hipokampus bölgesindeki GSH (glutasyon) düzeyleri. (*, ** $p<0.05$). Kont: Kontrol; STZ: Streptozotosin; STZ+NÇ-I: Streptozotosin + Nar Çiçeği-I, STZ+NÇ-II: Streptozotosin + Nar Çiçeği-II, STZ+NÇ-III: Streptozotosin + Nar Çiçeği-III

3.4. Hipokampusda GFAP düzeyleri:

Olgun astrositlerin esas intermedier filament proteini olan GFAP STZ grubunda kontrol grubuna göre artma tespit edildi. GFAP' nin 49 kDa'lık esas bandı STZ grubunda çok yüksek düzeyde eksprese edilmiştir (* $p<0.05$). Buna karşılık STZ+NÇ-III grubunun kontrole en yakın sonuç vermesinden dolayı STZ+NÇ-III ile STZ grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olup (** $p<0.05$) GFAP ekspresyonu STZ grubundan daha düşüktür (Şekil 9).



Şekil 9:Çalışma Gruplarına Ait Hipokampus GFAP Protein Ekspresyonları, (*,** $p<0.05$). Kont: Kontrol; STZ: Streptozotosin; STZ+NÇ-I: Streptozotosin + Nar Çiçeği-I, STZ+NÇ-II: Streptozotosin + Nar Çiçeği-II, STZ+NÇ-III: Streptozotosin + Nar Çiçeği-III

4. TARTIŞMA

Diyabet, dünya genelini ilgilendiren kronik bir rahatsızlıktır. Bu hastalık, kronik hiperglisemiyle ve karbohidrat, protein ve lipid metabolizmasındaki düzensizliklerle bağlantılı olacak şekilde nispeten veya tamamen insülin salınımındaki azalmayla karakterize edilir [132].

Oksidatif stres, oksijen radikalleri ve organizmanın antioksidan potansiyelindeki dengesizlikten kaynaklanmaktadır [3]. Serbest radikal üretiminin yükselmesi veya antioksidan aktivitesinin düşmesi ile oksidatif stres meydana gelebilir. Çeşitli çalışmalar, diyabetin artan serbest radikallerin oluşmasıyla ve antioksidan potansiyelindeki azalmayla bağlantılı olduğunu göstermiştir. Bu durum hücresel komponentlerin lipidler, proteinler, nükleik asitler gibi oksidatif hasarına sebep olur. Hem insüline bağımlı tip 1 ve hem de insüline bağımlı olmayan diyabette oksidatif stresin artışı gözlenmektedir [132].

STZ ile oluşturulan diyabet deneysel olarak iyi bir modeldir. STZ ile oluşan diyabette hiperglisemi sonucu kronik oksidatif stres oluşur. Diyabetik hastalarda ve diyabet deneylerinde oksidatif stresin ve antioksidanların nöron hasarına etkileri çalışılmıştır. Diyabetle ilişkili hiperglisemi ROS formasyonu meydana getirir, bu da hücre membranının lipid peroksidasyonunu başlatır, DNA hasarı yapar böylece oksidan proteinler tarafından nöronal ölüm artar [13].

Oksidatif strese sebep olan serbest radikal gruplarından biri ROS'dir. ROS diyabetlilerde yükselir. Periferik sinirler için ROS direkt olarak nöronları ve Schwann hücrelerini tahrip edebilir ve diyabetle birlikte antioksidan koruma mekanizmalarını tehlikeye atar [43].

Son zamanlarda bitkisel materyallerdeki doğal antioksidanlara olan ilgi artmıştır. Hem bilimsel raporlardan ve hem de laboratuvar çalışmalarından elde edilen bilgiler göstermiştir ki bitkiler çok çeşitli antioksidan özellikte maddeler ihtiva etmektedir. Antioksidan özellik gösteren fitokimyasalların bazıları polifenoller, monoterenler, lignanlar, flavonoidler, diterpenler, taninler gibi maddelerdir [133].

Nar çiçeklerinin diyabetin tedavisinde etkili olduğu belirtilmiştir. Nar bitkisinin çeşitli ekstraktlarını antibakteriyel, antifungal, antiülser, antidiyabetik, antioksidan özellikte olduğu çeşitli literatürlerde belirtilmektedir [65,134,135,136]. Flavonoidler, en önemli ve en yaygın fenolik bileşiklerdendir [137,138]. Bu bileşiklerin, fenolik yapılarından dolayı diyabetinde içinde olduğu serbest radikal aracılı rahatsızlıklarda faydalı olduğu bildirilmektedir [139]. Nardan elde edilen çeşitli alkaloidler, flavonoidler, polifenolik bileşikler, taninlerin (punicalin, pedunculagin, punicalagin, gallic ve ellagic asit esterleri) kuvvetli antioksidan özellikte olduğu bildirilmiştir [136].

Şimdiye kadar nar bitkisinin çiçeklerinin antioksidan etkisiyle ilgili çalışmalar çok az miktarda rapor edilmiştir. Son zamanlarda *Punica granatum* çiçeğinin yapılan litaretür taramalarında antioksidan etki gösterdiği saptanmıştır. Antioksidan etkisini sahip olduğu polifenolik bileşenleri sayesinde gösterdiği vurgulanmaktadır [68]. Nar çiçeğinin posprandial hiperglisemi ve glukoz toleransını düzenlediği bulunmuştur [65].

Nar çiçeğinin antidiyabetik ve kanamayı durdurucu kuvvetli etkisinin olduğu belirtilmektedir [62]. Hem *in vitro* ve hem de *in vivo* modeller kullanarak nar çiçeğinin alkolik ekstraktlarının antioksidan aktivitesi çalışılmıştır. *In vitro* olarak ekstraktların çeşitli reaktif oksijen ve azot türlerini temizlediğini ve biyomoleküllerin oksidasyonunu engellediği bulunmuştur. *In vivo* olarak ise farelerde serbest radikal oluşumuna neden olan ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)'ın sebep olduğu hepatoksisiteye karşı nar çiçeğinin koruyucu aktivitesinin olduğu bulunmuştur [140]. Nar çiçeği diyabetin tedavisinde kullanıldığı belirtilmektedir. Nar çiçeği ekstraktının normal ve alloxan ile diyabet oluşturulmuş ratlarda hipoglisemik etkisinin olduğu rapor edilmiştir [65]. Son zamanlarda nar çiçeğinin ratlarda posprandial hiperglisemi ve glukoz toleransını düzenlediği bulunmuştur [136]. Bununla birlikte, narın ve nar çiçeğinin lipid metabolizmasının düzenlenmesiyle ilgili etkisi hakkında çok az şey bilinmektedir. Çalışma da *Punica granatum*'un çiçeklerinin ekstraktlarının diyabetin tedavisinde antihiperglisemik etkisinin olduğu rapor edilmiştir [140].

PPAR- γ vücuttaki glukoz metabolizmasının homeostazisinde önemli rol oynar. PPAR- γ 'nin etkisi insülin reseptörlerinin hassasiyetini artırmaya yöneliktir. Nar çiçeği ekstraktlarının PPAR- γ geninin ekspresyonunu uyardığı bildirilmektedir.

Bu çalışma göstermiştir ki gallic acid, PPAR- γ 'ın aktivasyonundan ve *in vitro* olarak PPAR- γ 'nın indüksiyonundan sorumlu olan doğal olarak bitkide bol bulunan ve antioksidan olarak bilinen tanin yapısında bir bileşiktir. Gallic asidin antiinflammatory (iltihap önleyici) gibi çeşitli biyolojik ve farmakolojik özellikleri rapor edilmiştir. Son olarak nar ekstraktlarının insanlarda ve atherosklerotik apolipoprotein-E eksikli (yetersiz) farelerde reaktif oksijen ve azot türevlerini temizleyerek oksidasyonu engellediği ve böylece atheroskleroz lezyonlarının oluşumunu ertelediği rapor edilmiştir [63]. Sonuç olarak bu çalışmalara göre nar çiçeğinin anti diyabetik etkisi PPAR- γ 'ın aktivasyonu yoluyla. Aynı zamanda atidiyabetik ve iltihap önleyici özelliği olan tıbbi bitkilerde yaygın olarak bulunan gallic asitin *in vitro* olarak bu mekanizmadan (PPAR- γ 'ın aktivasyonu) sorumlu olduğu bulunmuştur [63].

Çalışmamız nar çiçeğinin antioksidan etki göstereceği dozlarda deneysel olarak STZ ile diyabet oluşturulmuş ratlara verilmesi ve diyabetin beyinde oluşturduğu oksidatif hasarı önlemesi ve antihiperglisemik etkisinin olduğunun saptanması üzerinedir. Rat beyinde özellikle hipokampusta diyabetin oluşturduğu semptomların hafızayı ve öğrenmeyi ne kadar etkilediği ve antioksidan etkisi olan nar çiçeğinin bu hasarı hangi dozlarda ne kadar önlediği araştırıldı.

Öğrenme ve hafıza bozukluğu, nörogenezisteki bozukluklardan kaynaklanabilir. Bu olasılığı test etmek için astrosit maturasyon belirteci olan GFAP protein düzeyine bakıldı. Astrositik hücrelerden başlangıçta vimentin sentezlenir, ancak astrositler olgunlaştıkça GFAP sentezi ağırlık kazanır [121]. Çalışmamızda STZ ile oluşturulmuş diyabet grubunda GFAP ekspresyonunun arttığı tespit edildi. Literatürlerde taramalarında bu durum gösterilmiştir [10]. GFAP'nin 49 kDa'lık esas bandı kontrole göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Antioksidan madde içeren ve bunu içerisindeki polifenolik bileşikler ve flavonoidler sayesinde sağlayan nar çiçeği uyguladığımız STZ gruplarında anlamlı olarak GFAP protein ekspresyonlarının gittikçe azaldığı, STZ+NÇ-III grubunun kontrol grubuna en yakın sonucu verdiği görülmüştür. STZ grubundaki GFAP protein sentezinin kontrol grubuna göre artması, diğer nar çiçeği verilen grupların STZ grubuna göre azalması nörogenezisteki bozuklukların kısmen düzeldiğini düşündürüyor.

Çalışmamız STZ ile diyabet oluşturulmuş gruplara değişik dozlarda nar çiçeği uygulaması ve buna bağlı olarak beyin dokusunda GFAP değişikliklerini, bunların öğrenme ile ilişkisini ve nar çiçeğini koruyucu etkisini araştıran ilk çalışmadır.

Serbest bir sülfidril grubuna sahip olan indirgenmiş GSH, hücre içi bir sülfidril tamponu olarak etkilidir ve hücreleri oksidatif ve toksik etkilere karşı korur. LPO sonucu açığa çıkan ürünler, membran permeabilitesini ve mikroviskozitesini önemli ölçüde etkilemektedir [152]. Kronik hiperglisemi LPO, protein oksidasyonu ve deoksiribonükleik asit oksidasyonu gibi artmış oksidatif stres belirteçlerine eşlik eder [141]. Yapılan çalışmalarda, diyabetik sıçanların çeşitli beyin bölgelerinde LPO seviyeleri yüksek, GSH seviyeleri düşük bulunmuştur [151]. Vitamin E, melatonin ve gabapentin ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda LPO seviyeleri, tedavi edilmeyen diyabetik gruba göre daha düşük, GSH seviyeleri ise daha yüksek bulunmuştur [142]. Morris Water Maze testinde yüksek LPO ve düşük GSH seviyeleri olan sıçanların öğrenmeleri kontrol grubuna göre daha bozuk bulunmuştur [13]. Bu bulgular artmış oksidatif stresin öğrenme ve hafızayı etkileyebileceği fikrini verebilir.

Biz çalışmamızda da diyabet (STZ) grubunda LPO seviyelerini kontrol grubuna göre yüksek tespit edildi. Beynin hipokampus bölgesindeki LPO (MDA+4-HDA) düzeyleri nar çiçeği verilen diyabetik gruplara yani STZ+Nar çiçeği-I, STZ+Nar çiçeği-II, STZ+Nar çiçeği-III gruplarına uygulanması ile diyabet grubundaki artmış lipid peroksidasyonu azalttığı kontrol grubuna en yakın sonuçların STZ+Nar çiçeği-II ve STZ+Nar çiçeği-III gruplarına ait olduğunu tespit edildi. Bu nedenle diyabetin oluşturduğu hasarın ve lipid peroksidasyon artışının dışarıdan yani eksojen olarak alınan antioksidanlarla azalabileceği nar çiçeğinin bu konuda etkili bir antioksidan olduğu ve antioksidan savunma sistemini güçlendirdiği sonucuna varılabilir. GSH seviyeleri ise diyabetik grupta kontrol grubuna göre düşük bulundu. Nar çiçeği uygulanması ile diyabetik gruptaki GSH seviyelerinde kısmen artış gözlemlendi. Kontrol grubuyla STZ+Nar çiçeği-II ve STZ+Nar çiçeği-III grupları arasındaki GSH seviyelerinde anlamlı bir farkın olmadığı tespit edildi. Nar çiçeği verilen diyabetik grupların özellikle STZ+Nar çiçeği-III grubunun GSH seviyesinin yükseldiği en ideal dozun bu grupta verildiği saptandı.

Bu durum bize diyabetli hastaların eksojen olarak alacakları antioksidan içerikli bitkilerin özellikle nar çiçeğinin tespit edilen dozda, oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı koruyucu olabileceğini gösterebilir. Yaptıkları deneysel çalışmada kontrol grubuna göre diyabetik grupta göz dokusunda glutatyon peroksidazın aktivitesinin 4. haftadan sonra önemli derecede azaldığını belirtmişlerdir. Diyabet grubunun glutatyon peroksidaz enzimi aktivitesi 0.028 U/mg protein iken 8. haftada bu değer 0.0099 U/mg protein olarak ölçülmüştür. 8. haftada glutatyon peroksidazın aktivitesi ortalama olarak üçte bir oranında azaldığını tespit etmişlerdir [143]. Hücrelerdeki antioksidan sistem katalaz, glutatyon peroksidaz ve süper oksidaz gibi enzimleri içermektedir. Bu sistemin aktif hale geçmesi ya da antioksidan seviyesini yükseltmek için antioksidan madde içeren bunuda içerisindeki bileşikler sayesinde sağlayan nar çiçeği gibi antioksidan bitkilerle fitoterapi uygulanarak oksidatif hasarın önlenmesi gerekmektedir. Nar çiçeği ekstraktlarının serbest radikalleri uzaklaştırdığı ve makrofaj oksidatif stresini ve hayvanlardaki lipid peroksidasyonunu azalttığını ve ayrıca yaşlı insanlarda plasma antioksidan kapasitesini artırdığı ifade edilmektedir. Ratlarla yapılan çalışmalarda nar çiçeğinden elde edilen ekstrakt peritoneal makrofajlardaki oksidatif stresi % 19, hücresel lipid peroksidasyonu % 42 azalttığı ve ayrıca glutatyon seviyesini de % 53 oranında artırdığı tespit edilmiştir [153].

Hipokampusun önemli görevlerinden birisi, primer belleğin (kısa süreli bellek) sekonder belleğe (uzun süreli, sabit bellek) çevrilmesine neden olan yapılanmayı sağlamaktır. Bazı bilgileri kalıcı deponun yer aldığı uzun süreli belleğin depo alanlarına taşır. Mekanizması tam olarak bilinmese de hipokampus olmadan uzun süreli belleğin pekiştirilmesi mümkün olmamaktadır. Ayrıca sağ hipokampus görsel, sol hipokampus ise sözel hafıza ile ilgili fonksiyonlarda daha fazla aktivite göstermekte ve bu bölgelerin lezyonlarında da ilgili hafızalarda kayıp gelişmektedir [146].

Diyabetik hastalarda, ılımlı bir serebral atrofi, beyin sapı lezyonları ve subkortikal lezyonlarda artış bildirilmiştir [15]. Yetişkinlerde, DM ile birlikte orta düzeyde öğrenme ve hafıza bozukluğu da görülmektedir [38]. Kronik hiperglisemi boyunca DM, bilişsel bozukluğa neden olmaktadır. Diyabetik hastalarda, serebral bozukluk gelişmesi tam bir glisemik kontrol ile geciktirilebilir. Ancak oluşan değişikliklerin geri dönüşümünün olup olmayacağı açık değildir.

Diyabetin çeşitli doku ve organlarda hasara neden olduğu bilinmektedir. Sinir sisteminde, özellikle merkezi sinir sisteminde yaptığı hasar nedeni ile bilişsel fonksiyonları bozduğu da bildirilmektedir [8]. STZ ile diyabet oluşturulan ratlarda Morris su tankında yer bulma öğrenmesi test edilerek benzer sonuçlar elde edilmiş ve diyabete bağlı olarak gelişen doku hasarı ve serebral kan akımı değişikliklerinin bilişsel fonksiyonların bozulmasından sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür [3, 147].

Diyabetin hipokampusda bulunan nöronal yapılarda nörotransmitter salgılanması ve nörotransmitterlerin reseptörlerle kombinasyonu düzeyinde kimyasal, yapısal ve fonksiyonel çeşitli bozulmalara ve nöronal apoptozise neden olarak bilişsel fonksiyonları bozduğu bildirilmiştir [148].

Literatürde diyabetik ratlarda serebral kan akımının azaldığı ve serebral disfonksiyon gelişmesinde vaskülopatinin etkili olduğu bildirilmiş ve ratlarda Water Mazz testinde öğrenme performansında görülen bozulma bu durum ile ilişkilendirilmiştir [150].

Çalışmamızda Water Maze Testi yaptığımız her beş grupta platformu bulma sürelerinin, STZ grubunda uzun kontrol grubunda daha kısa nar çiçeği verilen gruplarda dozu artırtıkça kontrol grubuna yakın olduğu tespit edildi. Bu nedenle diyabetik ratların hafızalarının kontrol grubuna göre daha kötü olduğunu ve diyabetik ratlara nar çiçeği verilmesinin hafıza bozukluğunu kısmen düzelttiğini gözlemledik. Her beş grubun günlerdeki platformu bulmak için katedilen yüzme mesafesinin STZ grubunda uzun olduğu nar çiçeği verildikçe yüzme mesafesinin kısaldığı tespit edildi. Bundan dolayı nar çiçeği verilen grupların öğrenme performanslarının arttığı ve hafızayı kuvvetlendirdiği belirlendi. Bu bulgular, diyabetin bozulan performansına etkisinin sensorimotor defisitlerden çok bilişsel bozukluklara bağlı olduğunu göstermiştir. Bu durum platformun lokalize olduğu hedef kuadranda geçirdikleri zamanın yüzdesi olarak verilen değerlerde nar çiçeği verilen grupların STZ grubuna göre daha çok kalması ve hedef kuadrana giriş sayılarının nar çiçeği verilen gruplarda artışı ile ispatlandı.

Sıçanlarda diyabetin bilişsel fonksiyonlara etkisini araştıran Papovic ve arkadaşları [148], STZ enjeksiyonunu takiben 1.8. ve 14. günlerde gelişen diyabetin öğrenme performansını azalttığı yönünde sonuçlar elde etmişler.

Öğrenme performansındaki azalmanın zamana bağlı olarak hipokampusdaki nöronal ve sinaptik bozulmaya paralel geliştiğini, ancak bozulmanın insülin tedavisi ile ilişkili olarak geri döndüğünü bildirmişlerdir.

Literatürdeki diğer birçok araştırma da diyabete bağlı olarak öğrenme ve belleğin komponentleri üzerinde ortaya çıkan zayıflamanın, beynin öğrenmede rol alan hipokampus vb. bölgelerinde zamana bağlı olarak oluşan nörokimyasal değişikliklerle ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır [149,150].

Çalışmamızda STZ grubundaki WMZ sonuçları literatürdeki çalışmalarla bu yorumumuzu destekler konumdadır ve STZ grubuna verilen nar çiçeğinin bilişsel fonksiyonları etkilediği öğrenme performansını kısmen artırdığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak STZ verilen ratlarda öğrenme ve bellek fonksiyonları bozulmakta, diyabetin serbest radikaller ve oksidan aktivitenin artması ile verdiği zararlar ve oksidatif hasar sonucu GFAP protein ekspresyonu ve lipid peroksidasyonu artmakta, glutatyon miktarı ise azalmaktadır sonuç olarak antioksidan savunma sistemi bozulmaktadır. Diyabetin meydana getirdiği oksidatif hasarın engellenmesi için antioksidan içeriği bakımından zengin polifenolik bileşikler ve flavonoidler içeren nar çiçeği belirtilen miktarlarda verilmesi sonucu ratlardaki bilişsel fonksiyonları etkilediği öğrenme ve bellek fonksiyonlarını kısmen düzelttiği GFAP protein ekspresyonunu ve lipid peroksidasyonunu azalttığı ve GSH'ı yükselttiği tespit edildi.

Ayrıca diyabetten kaynaklanan reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu, nar çiçeğinin antioksidan sistemine içeriğindeki polifenolik bileşikler ve flavonoidlerle etki ederek kısmen azalttığı gözlenmiştir. Tüm bu ölçümler diyabet nedeniyle meydana gelebilecek nöronal değişikliklerin mekanizmasını açıklayacak son derece önemli kriterlerdir. Sonuç olarak diyabet ile ilgili nörodejeneratif ve bilişsel fonksiyon bozukluklarının oluşturduğu hasarların beslenmede kullanacağımız nar çiçeğiyle kısmen düzelebileceği kanısı oluşmuştur. Bu sonuçlar nar çiçeğinin diyabetin tedavisi ve oluşturduğu hasarlardan korunma yöntemlerinin geliştirilmesine önemli katkı sağlayacağı göstermektedir. Özellikle bilimsel çalışmalarla elde ettiğimiz verilerin diyabetin komplikasyonlarının önlenmesinde kullanılan alternatif tıbbi bilimsel bir bakış açısı kazandırdığı düşüncesindeyiz.

5. KAYNAKLAR

- [1]. Vincent, A.M., Russell J.W., Low, P. and Feldman, E.L.,1975. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews*, 25, 612–628, 2004.
- [2]. Memişoğulları R, Bakan E: Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 18: 193– 197, 2004.
- [3]. Li ZG, Zhang W, Grunberger G, Sima AAF. Hippocampal neuronal apoptosis in type1 diabetes. *Brain Res* 2002, 946 (2): 221-231.
- [4]. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N: Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. 2005 *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 668–676
- [5]. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C: Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine*. 39: 841 – 852, 2005.
- [6]. Popovic, M. Biessels, G.J. Isaacson, R.L. Gispen, W.H. 2001, Learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats in a novel spatial/object discrimination task, *Behavioural Brain Research*, 122, 201–207.
- [7]. Nunro N, Felton A, McIntosh C. Is multidisciplinary learning effective among those caring for people with diabetes *Diabetic Medicine: a Journal of The British Diabetic Association* 2002, 19: 799-803.
- [8]. Manschot MS, Biessels GJ, Cameron NE, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition partially prevents deficits in water maze performance, hippocampal synaptic plasticity and cerebral blood flow in streptozotocin diabetic rats. *Brain Res* 2003, 966(2): 274-278

- [9]. Baydas G, Nedzvetskii VS, Tuzcu M, Yasar A, Kirichenko SV. Increase of glial fibrillary acidic protein and S-100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: effects of vitamin E. *Eur J Pharmacol* 2003; 462: 67-71.
- [10]. Baydas, G. Reiter, RJ., Yasar, A., Tuzcu, M., Akdemir, I., Nedzvetskii, VS., 2003, Melatonin reduces glial reactivity in the hippocampus, cortex, and cerebellum of streptozotocin-induced diabetic rats, *Free Radical Biology and Medicine*, 35, 797-804.
- [11]. Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee L. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 932-939.
- [12]. Young IS, Torney JJ, Trimble ER. The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free Rad Biol Med* 1992; 13: 41-46.
- [13]. Tuzcu M, Baydas G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced and memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol.* 2006; 537: 106–110
- [14]. Kaur, C. ve Kapoor, H. C. (2005). Antioxidant activity of some fruits in Indian diet. *Acta Horticulturae*, 696, 563-565.
- [15]. Araki Y, Nomura M, Tanaka H, Yamamoto H, Yamamoto T, Tsukaguchi I. MRI of the brain in diabetes mellitus. *Neuroradiology* 1994; 36: 101–103.
- [16]. WHO Consultation Group. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, 2nd ed. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus WHO/NCD/NCS/99. Geneva: World Health Organisation, 1999: 1-59.
- [17]. Gavin JR III, Alberti KGMM, Davidson MB, De Fronzo RA, Drash A, Gabbe SG, et al. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-1197.

- [18]. Tanaka S, Kobayashi T, Momotsu T. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2000; 342: 1835-1837.
- [19]. Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *JAMA* 1999;281:2005-2012.
- [20]. Daimon M, Hama K, Susa S, Kimura M, Yamatani K, Ohnuma H, Manaka H, Kato T. Hyperglycemia is a factor for an increase in serum ceruloplasmin in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 21: 1525-1528, (1998)
- [21]. Radfar M, Larijani B, Hadjibabaie M, Rajabipour B, Mojtahedi A, Abdollahi M: Effects of pentoxifylline on oxidative stress and levels of EGF and NO in blood of diabetic type-2 patients: a randomized, double-blind placebo-controlled clinical trial. *Biomed Pharmacother.* 59(6):302-6, 2005
- [22]. Dabelea D, Pettitt DJ, Jones KL, Arslanian SA. Type 2 diabetes mellitus in minority children and adolescents. An emerging problem. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999; 28: 709-729
- [23]. Maassen JA. Mitochondrial diabetes: pathophysiology, clinical presentation, and genetic analysis. *Am J Med Genet* 2002; 115: 66-70.
- [24]. Moraes CT, Ricci E, Bonilla E, Diamuro S, Schon EA. The mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke like episodes (MELAS): genetic, biochemical, and morphological correlations in skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 934-949.

- [25]. Steiner DF, Tager HS, Chan SJ, Nanjo K, Sanke T, Rubinstein AH. Lessons learned from molecular biology of insulin-gene mutations. *Diabetes Care* 1990; 13: 600-609.
- [26]. Taylor SI. Lilly Lecture: molecular mechanisms of insulin resistance. Lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene. *Diabetes* 1992; 41: 1473-1490.
- [27]. Stoss H, Pesch HJ, Pontz B, Otten A, Spranger J. Wolcott-Rallison syndrome: diabetes mellitus and spondyloepiphyseal dysplasia. *Eur J Pediatr* 1982; 138: 120-129.
- [28]. Jaeckel E, Manns M, Von Herrath M. Viruses and diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 958: 25.
- [29]. Almind K, Doria A, Kahn CR. Putting the genes for type II diabetes on the map. *Nat Med* 2001; 7: 277-279.
- [30]. Midenia E, Segato T, Radin S, di Giorgio G, Meneghini F, Piermarocchi S, et al. Studies on the retina of the diabetic db/db mouse. I. Endothelial cell-pericyte ratio. *Ophthalmic Res* 1989; 21: 106-111.
- [31]. Agardh CD, Agardh E, Zhang H, Ostenson CG. Altered endothelial / pericyte ratio in Goto-Kakizaki rat retina. *J Diabetes Complications* 1997; 11: 158-162.
- [32]. Ganong, W.F. 1995, *Tıbbi Fizyoloji*. 16. baskı. Editör: Doğan. A. Barış Kitabevi, İstanbul. Bölüm 19, 365-386.
- [33]. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on paradigm. *Diabetes* 1999;48: 1-9.

- [34]. Noyan, A. Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. 8.Baskı. Basım, yayım Meteksan A.Ş. Ankara, S: 1993, 421-426, 1055- 1066.
- [35]. Velazques B, Winocour PH, Kesteven P, Alberti KGMM, Lakeer MF. Relation of lipid peroxides to macrovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetic Medicine* 1991; 8: 752-758.
- [36]. Biessels, GJ., Kappelle, AC., Bravenboer, B., Erkelens, DW., Gispen, WH., 1994, Cerebral function in diabetes mellitus, *Diabetologia*, 37, 643-650.
- [37]. Reaven, GM., Thompson, LW., Nahum, D., Haskins, E., 1990, Relationship between hyperglycemia and cognitive function in older NIDDM patients, *Diabetes Care*, 13, 16-21.
- [38]. Stewart, R., Liolitsa, D., 1999, Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia, *Diabetic Medicine*, 16, 93–112.
- [39]. Wollf SP. Diabetes mellitus and free radicals. *Br Med Bull* 1993; 49: 642-652.
- [40]. Scribner KA, Akana SF, Walker CD, Dallman MF. Streptozotocin-diabetic rats exhibit facilitated adrenocorticotropin responses to acute stress, but normal sensitivity to feedback by corticosteroids. *Endocrinology* 1993; 133: 2667-2674.
- [41]. Birrell AM, Heffernan SJ, Ansselin AD, McLennan S, Church DK, Gillin AG, et al. Functional and structural abnormalities in the nerves of type 1 diabetic baboons: aminoguanidine treatment does not improve nerve function. *Diabetologia* 2000; 43: 110-116.
- [42]. Sima AA, Sugimoto K. Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia* 1999; 42: 773-788.

[43]. Packer L. The role of anti-oxidative treatment in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993; 36: 1212-1213.

[43]. Baydas, G., Reiter, RJ., Nedzvetskii, VS., Yasar, A., Tuzcu, M., Ozveren, F., Canatan, H., 2003, Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis, *Toxicology Letter*, 137, 169-174.

[44]. Strain JJ. Disturbances of micronutrient and antioxidant status in diabetes. *Proc Nutr Soc* 1991; 50: 591-604.

[45]. Baynes JW. Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-412.

[46]. MacRury SM, Gordon D, Wilson R, Bradley H, Gemmell CG, Paterson JR, et al. A comparison of different methods of assessing free radical diabetes and peripheral vascular disease. *Diabetic Medicine* 1993; 10: 331-335.

[47]. El-Missiry MA, El Gindy AM. Amelioration of alloxan-induced diabetes mellitus and oxidative stress in rats by oil of *Eruca sativa* seeds. *Ann Nutr Metab* 2000;44(3):97–100.

[48]. Rauscher FM, Sanders RA, Watkins JB III. Effects of isoeugenol on oxidative stress pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Tox* 2001;15: 159–164.

[49]. Komers R, Oyama TT, Chapman JG, Allison KM, Anderson S. Effects of systemic inhibition of neuronal nitric oxide synthase in diabetic rats. *Hypertension* 2000;35(2):655–661.

- [50]. Obrosova IG, Fathallah L, Greene DA. Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: Effect of DL- α -lipoic acid. *Eur J Pharmacol* 2000;398:139–146.
- [51]. Baytop, T. (1999). “Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün)”, II. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- [52]. Chamberlain, D.F. (1982). Punicaceae, “Flora of Turkey and the East Aegean Islands” Cilt IV, (Ed. D.F. Chamberlain)’de, University Press, Edinburghs, 173-174.
- [53]. Naqvi SA, Khan MS, Vohora SB. Antibacterial, antifungal, and antihelminthic investigations on Indian medicinal plants. *Fitoterapia* 1991;62: 221-228.
- [54]. Lansky EP, Newman RA. 7. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 2007;109:177-206.
- [55]. Neuhofer H, Witte L, Gorunovic M, et al. Alkaloids in the bark of *Punica granatum* L. (pomegranate) from Yugoslavia. *Pharmazie* 1993;48: 389-391.
- [56]. Rufeng Wang, Wei Wang, Liang Wang, Ruining Liu, Yi Ding, Lijun Du. Constituents of the flowers of *Punica granatum* 2006 Elsevier B.V.
- [57]. Nawwar MA, Hussein SA, Merfort I. NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*. *Phytochemistry* 1994;36: 793-798.
- [58]. Davis, P.H. (1982). “Flora of Turkey and the East Aegean Islands”, Cilt IV, University Press, Edinburgh.
- [59]. Manav, S. (1988). Nar (*Punica granatum* L.) meyva kabuklarını eczacılıkta değerlendirme açısından Türkiye’de yetişen doğal ve kültür nar çeşitlerinin karşılaştırılması. Yüksek lisans tezi Ankara Üniversitesi, Ankara

[60]. Şule AKSU, *Punica granatum* L. üzerinde farmakognozik araştırmalar yüksek lisans tezi Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2007.

[61]. Yentür, S. Bitki Anatomisi, İ.Ü. Fen Fak. Yay. 2003

[62]. Huang, T.H.W. Peng, G. Kota, B.P. Li, G.Q. Yamahara, J., Roufogalis, B.D. ve diğerleri (2005). Pomegranate flower improves cardiac lipid metabolism in a diabetic rat model: role of lowering circulating lipids. *British Journal of Pharmacology*, 145(6), 767-774, Ref: C. A. 143:206092.

[63]. Huang, T.H. W. Peng, G. Kota, B.P. Li, G.Q. Yamahara, J., Roufogalis, B.D. ve diğerleri. (2005). Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: Activation of PPAR- α and identification of an active component. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2), 160-169.

[64]. Huang, T.H.W. Peng, G., Kota, B.P., Li, G.Q., Yamahara, J., Roufogalis, B.D. ve diğerleri. (2005). Pomegranate Flower Extract Diminishes Cardiac Fibrosis in Zucker Diabetic Fatty Rats: Modulation of Cardiac Endothelin-1 and Nuclear Factor-kappaB Pathways. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 46(6), 856-862, Ref: C. A. 144:64120.

[65]. Jafri, M.A., Aslam, M., Javed, K., Singh, S., 2000. Effects of *Punica granatum* Linn Flowers on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 70, 309–314.

[66]. Wieraszko, A., Ball, G.F., 1993, Long-term potentiation in the avian hippocampus does not require activation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, *Synapse*, 13(2), 173-178.

- [67]. Guyton, A.C., Hall, J.E., 1996, Tıbbi Fizyoloji, 9. baskı. Editör: Çavuşoğlu H., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Bölüm 57, 757-758.
- [68]. Taner D. Fonksiyonel Anatomi, ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş.-Metu Press-Yayınları, Ankara. 1998; 231-232.
- [69]. Muller, D. Djebbara-Hannas, Z. Jourdain, P. Vutskits, L. Durbec, P. Rougon, G. Kiss, JZ. 2000, Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 97, 4315-4320.
- [70]. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47–95. Review.
- [71]. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84. Review.
- [72]. Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marín N, Romá J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Health Perspect* 1998; 106 (Suppl 5): 1229-1234. Review.
- [73]. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* 1993; 49:481-493.
- [74]. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160:1–40.
- [75]. Aslan R, Şekeroğlu MR, Bayıroğlu F. Serbest Radikal Türlerinin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Hücresel Antioksidan Savunma YYÜ Sağ Bil Derg 1995; 2: 137-142.

[76]. Ganong WF. Tıbbi Fizyoloji, Nobel Tıp Kitabevleri, 20. baskı. İstanbul 2002; Bölüm: 16, 259-263.

[77]. Baydas, G., Canatan, H., Turkoglu, A., 2002, Comparative analyses of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozocin-induced diabetes mellitus, *Journal of Pineal Research*, 32, 225-229.

[78]. Coyle, JT., Puttfarcken, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders, *Science*, 1993. 262, 689-695.

[79]. Reiter, RJ., Guerrero, JM., Garcia, JJ., Acuna-Castroviejo D., 1998, Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging, Relation to melatonin, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 410-424.

[80]. Halliwell, B. 1989, Oxidant and the central nervous system: some fundamental questions, *Acta Neurologica Scandinavica*, 126, 23-33.

[81]. Rouach, H., Ribiere, C., Park, M. K., Saffar, C., Nordmann, R., 1987, Lipid peroxidation and brain mitochondrial damage induced by ethanol, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 18, 211- 217.

[82]. Urano, S. Sato, Y. Otonari, T., Makabe, S., Suzuki, S., Ogata, M., Endo, T., 1998, Aging and oxidative stress in neuradegeneration, *Biofactors*, 103-112.

[83]. Daniloff, J.K., Levi, G., Grumet, M., Rieger, F., Edelman, GM., 1986, Altered expression of neuronal cell adhesion molecules induced by nerve injury and repair, *Journal of Cellular Biology*, 103, 929-945.

- [84]. Stadtman, E., Free radicals in the genesis of Alzheimer's disease, *Annals of New York Academy of Science*, 1992. 695, 73-76.
- [85]. Fukui, K., Onodera, K., Shinkai, T., Suzuki, S., Urano, S., 2001, Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems, *Annals of the New York Academy of Science*, 928, 168-175.
- [86]. Halliwell B, Gutteridge J 2000. Free radicals, other reactive species and disease. In: *Free radicals in biology and medicine*. Oxford Scientific Publications, Oxford, p 617–783
- [87]. Baydas G, Nedzvetsky VS, Nerush PA, Kirichenko SV, Demchenko HM, Reiter RJ. A novel role for melatonin: regulation of the expression of cell adhesion molecules in the rat hippocampus and cortex. *Neurosci Lett* 2002; 326:109-112.
- [88]. Urano, S. Asai, Y. Makabe, S., Matsuo, M., Izumiyama, N., Ohtsubo, K., Endo, T., 1997, Oxidative injury of synapse and alteration of antioxidative defense systems in rats and its prevention by vitamin E, *European Journal of Biochemistry*, 245, 64-70.
- [89]. Low, P.A. , Nickander, K.K., Tritschler, H.J., 1997, The role of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy, *Diabetes*, 46, 38-42.
- [90]. Zaltzberg, H., Kanter, Y., Aviram, M., Levy, Y., 1999, Increased plasma oxidizability and decreased erythrocyte and plasma antioxidative capacity in patients with NIDDM, *Israel Medical Association Journal*, 1, 228–231.
- [91]. Greene, D.A., Stevens, M.J., Obrosova, I., Feldman, E.L., 1999, Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy, *European Journal of Pharmacology* 375, 217–223.

- [92]. Celik, S., Baydas, G., Yılmaz, O., 2002, Influence of vitamin E on the levels of fatty acids and MDA in some tissues of diabetic rats, *Cell Biochemistry and Function*, 20, 67-71.
- [93]. Kamal A, Biessels GJ, Duis SE, Gispen WH. Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: Interaction of diabetes and ageing. *Diabetologia* 2000; 43: 5000-5006.
- [94]. Biessels GJ, Kamal A, Ramakers GM, Urban IJ, Spruijt BM, Erkelens DW, et al. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1996; 45: 1259-1266.
- [95]. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004; 134: 489-492. Review.
- [96]. Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 2004; 104:6255–6285.
- [97]. Meister A. On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 1905-1915.
- [98]. McCoy RN, Hill KE, Ayon MA, Stein JH, Burk RF. Oxidant stress following renal ischemia: changes in the glutathione redox ratio. *Kidney Int* 1988; 33: 812-817.
- [99]. Ripalda MJ, Rudolph N, Wong SL. Developmental patterns of antioxidant defense mechanisms in human erythrocytes. *Pediatr Res* 1989; 26: 366-369.

- [100]. Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:9748-9752.
- [101]. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems. *The Journal of Lipid Research* 1998; 39:1529-1542.
- [102]. Fink SP, Reddy GR, Marnett LJ. Mutagenicity in *Escherichia coli* of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8652–8657.
- [103]. Wang MY, Dhingra K, Hittelman WN, Liehr JG, deAndrade M, Li DH. Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde–DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1996; 5: 705–710.
- [104]. Iles KE, Liu RM. Mechanisms of glutamate cysteine ligase (GCL) induction by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 547-556. Review.
- [105]. Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003; 26: 137-146. Review.
- [106]. Baydas G, Ozer M, Yasar A, Koz ST, Tuzcu M. Melatonin prevents oxidative stress and inhibits reactive gliosis induced by hyperhomocysteinemia in rats. *Biochem Moscow* 2006; 71: 91-95.
- [107]. Hermenegildo C, Raya A, Romá J, Romero FJ. Decreased glutathione peroxidase activity in sciatic nerve of alloxan-induced diabetic mice and its correlation with blood glucose levels. *Neurochem Res* 1993; 18: 893–896.

- [108]. Martínez-Blasco A, Bosch-Morell F, Trenor C, Romero FJ. Experimental diabetic neuropathy: role of oxidative stress and mechanisms involved. *Biofactors* 1998; 41–43.
- [109]. Low P.A. , Nickander KK. Oxygen free radical effects in sciatic nerve in experimental diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 873–877.
- [110]. Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzer JD, Raya A, Wittrock DA, Tritschler H, Low PA. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress, and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1995; 18:1160–1167.
- [111]. Jensson H, Guthenberg C, Alin P, Mannervik B. Rat glutathione transferase 8-8, an enzyme efficiently detoxifying 4-hydroxyalk-2-enals. *FEBS Lett* 1986; 203:207–209
- [112]. Danielson UH, Esterbauer H, Mannervik B. Structure-activity relationships of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalysed by mammalian glutathione transferases. *Biochem J* 1998; 247:707–713.
- [113]. Dickinson DA, Iles KE, Watanabe N, Iwamoto T, Zhang H, Krzywanski DM, Forman HJ. 4-hydroxynonenal induces glutamate cysteine ligase through JNK in HBE1 cells. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 974.
- [114]. Liu RM, Gao L, Choi J, Forman HJ. gamma-glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal. *Am J Physiol* 1998; 275(5 Pt 1):861-869.
- [115]. Shea TB, Rogers E, Ashline D, Ortiz D, Sheu MS. Apolipoprotein E deficiency promotes increased oxidative stress and compensatory increases in antioxidants in brain tissue. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1115–1120.

[116]. Dyck PJ (editor). Periferik Nöropati. Harati Y (Çeviren). Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı, İstanbul. 1992; 231-264.

[117]. Fields RD, Itoh K. Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. Trends Neuroscience 1996; 19: 473-480.

[118]. Hutchins JBand Casagrande V.A. Vimentin: changes in distribution during brain development. Glia 1989; 2: 55–56.

[119]. McCall MA, Gregg RG, Behringer RR, Brenner M, Delaney CL, Galbreath EJ, et al. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (GFAP) alters neuronal physiology. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 6361-6366.

[120]. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). Neurochem Res 2000; 25: 1439-1451. Review.

[121]. Gomes FC, Paulin D, Moura Neto V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. Braz J Med Biol Res 1999; 32: 619–631

[122]. Yang Q, Hamberger A, Wang S, Haglid KG. Appearance of neuronal S-100 beta during development of the rat brain. Brain Res Dev Brain Res 1996; 91: 181-189.

[123]. Quinlan RA, Brenner M, Goldman JE, Messing A. GFAP and its role in Alexander disease. Exp Cell Res 2007; 313:2077-2087. Review.

[124]. Bloomfield SM, McKinney J, Smith L, Brisman J. Reliability of S100B in predicting severity of central nervous system injury. Neurocrit Care 2007; 6: 121-138. Review.

- [125]. Baydas G, Ozveren F, Tuzcu M, Yasar A. Effects of thinner exposure on the expression pattern of neural cell adhesion molecules, level of lipid peroxidation in the brain and cognitive function in rats. *Eur J Pharmacol* 2005; 512:181–187.
- [126]. Baydas G, Nedzvetsky VS, Nerush PA, Kirichenko SV, Demchenko HM, Reiter RJ. A novel role for melatonin: regulation of the expression of cell adhesion molecules in the rat hippocampus and cortex. *Neurosci Lett* 2002; 326:109-112.
- [127]. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680–685.
- [128]. Harlow E, Lane D. *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1988: 471-504.
- [129]. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* 1981; 112: 195-203.
- [130]. Harlow, E. Lane, D. 1988, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 635-656.
- [131]. Fowler, SJ. 1995, Use of monoclonal antibodies for western blotting with enhanced chemiluminescent detection, In: Davis, WC. (ed). *Monoclonal Antibody Protocols*, Humana Press, New Jersey, 115-127.
- [132]. Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. *Joslin's Diabetes Mellitus*. Fourteenth edition. Lippincott Williams and Wilkins, Boston. 2005; 331-338.

- [133]. Nandkarni, A.K., 1976. Nandkarni's Indian Materia Medica. Popular Prakashan, Bombay. pp. 1031–1035.
- [134]. Charya, M.A.S., Reddy, S.M., Kumar, B.P., Reddy, S.R., 1979. Laboratory evaluation of some medicinal plant extracts against two pathogenic fungi. *New Botany* 6,171
- [135]. Ajaikumar, K.B. Asheef, M. Babu, B.H., Padikkala, J., 2005. The inhibition of gastric mucosal injury by PGL (pomegranate) methanolic extract. *J. Ethnopharmacol.* 96, 171–176
- [136]. Bagri P, Ali M, Aeri V, Bhowmik M, Sultana S. Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. 2009 Jan;47(1):50-4.
- [137]. Schinella, G.R. Tournier, H.A. Prieto, J.M., Mordujovich de Buschiazso, P., Rios, J.L. 2002. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sci.* 70, 1023–1033.
- [138]. Tepe, B. Sokmen, M. Akpulat, A.H., Sokemen, A., 2005. In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. *Food Chem.* 90, 685–689.
- [139]. Czinner E, Hagymási K, Blázovics A, Kéry A, Szoke E, Lemberkovics E. In vitro antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. 2000 Dec;73(3):437-43
- [140]. Kaur G, Jabbar Z, Athar M, Alam MS. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. 2006 Jul;44(7):984-93.

- [141]. Baydas G, Reiter RJ, Nedzvetskii VS, Yasar A, Tuzcu M, Ozveren F, et al. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicology Letter* 2003; 137: 169-174.
- [142]. Baydas G, Reiter RJ, Akbulut M, Tuzcu M, Tamer S. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. *Neuroscience* 2005; 135:879-886.
- [143]. Tuzcu, M., 2000, Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda Serbest Radikal Reaksiyonlarının Lensdeki Rolü ve Antioksidanlar, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- [144]. Yue KK, Leung SN, Man PM, Yeung WF, Chung WS, Lee KW, Leung AW, Cheng CH. Alterations in antioxidant enzyme activities in the eyes, aorta and kidneys of diabetic rats relevant to the onset of oxidative stress. *2005 Jul 1;77(7):721-34.*
- [145]. Şekeroğlu MR, Şahin H, Dülger H, Algün E: The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem.* 33: 669-674, 2000.
- [146]. Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M. Hipokampus Türkiye Klinikleri *J Med Sci* 2001; 21: 427
- [147]. Gardoni F, Kamal A, Belone C, et al. Effectsof streptozotocin-diabetes on the hippocampal NMDA receptor complex in rats. *J Neurochem* 2002, 80(3): 438-447.

- [148]. Papović M, Biessels GJ, Isacson RL, Gispen WH. Learning and memory in streptozotocin induced diabetic rats in a novel spatial object partially prevents deficits in water maze performance, hippocampal synaptic plasticity and cerebral blood flow in streptozotocin diabetic rats. *Brain Res* 2003, 966(2): 274-282
- [149]. Reagen LP, McEwan BS. Diabetes, but not stress, reduces neuronal nitric oxide synthase expression in rat hippocampus: implications for hippocampal synaptic plasticity. *Neuroreport* 2002, 13(14): 1801-1804.
- [150]. Blokland A, de Vente J, Prickaerts J, Honig W, Markerink-van Ittersum M, Steinbusch H. Local inhibition of hippocampal nitric oxide synthase does not impair place learning in the morris water escape task in rats. *Eur J Neurosci* 1999, 11 (1): 223-232.
- [151]. Hagglof B, Marklund SL, Holmgren G. CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocytes in insulin-dependent diabetic children. *Acta Endocrinology* 1983; 102: 235-239.
- [152]. McAuley DF, Hanratty CG, McGurk C, Nugent AG, Johnston GD. Effect of methionine supplementation on endothelial function, plasma homocysteine, and lipid peroxidation. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999, 37: 435–440.
- [153]. Obrosova IG, Stevens MJ. Effect of dietary taurine supplementation on GSH and NAD(P)-redox status, lipid peroxidation, and energy metabolism in diabetic precataractous lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(3): 680–688.
- [154]. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. 2001 *J Clin Pathol* 54: 176- 186

